VERZAMELDE GESCHRIFTEN
VAN
M. W. BEIJERINCK

TER GELEGENHEID VAN ZIJN
70STEN VERJAARDAG

MET MEDEWERKING DER NEDERLANDSCHE
REGEERING UITGEGEVEN DOOR ZIJNE
VRIENDEN EN VEREERDERS

DERDE DEEL

DELFT / MDCCCCXXI



VERZAMELDE GESCHRIFTEN VAN M. W. BEIJERINCK

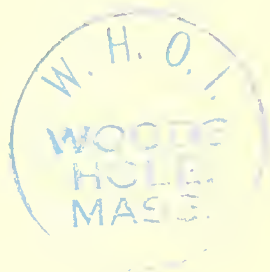
VERZAMELDE GESCHRIFTEN

VAN

M. W. BEIJERINCK

TER GELEGENHEID VAN ZIJN
70STEN VERJAARDAG

MET MEDEWERKING DER NEDERLANDSCHE
REGEERING UITGEGEVEN DOOR ZIJNE
VRIENDEN EN VEREERDERS



DERDE DEEL

DELFT / MDCCCCXXI

Impr.: F. Bruckmann A.G. und J. B. Obernetter, München

DERDE DEEL



Inhoud van het Derde Deel.

Verfahren zum Nachweise der Säureabsonderung bei Mikrobien.

Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde, Jena. IX. Band, 1891. S. 781—786.

1. Der Kreideboden.

Während die Vermischung der Nährgelatine mit Farbstoffen, welche für Säuren und Alkalien empfindlich sind, wie Lakmus, Phenolphtoleine etc. schon mehrfach für die Untersuchung der Säurebildung durch Mikrobien verwendet und beschrieben wurde, glaube ich, dass folgendes Verfahren zuerst von mir in Anwendung gebracht ist.

Es beruht darauf, in einem undurchsichtigen Nährboden die für das Wachsthum schädliche Säure sofort nach der Entstehung zu binden und in ein lösliches, unschädliches Salz überzuführen, indem dabei ein unlöslicher Körper verschwindet, wodurch der Nährboden stellenweise durchsichtig wird.

Man verfährt dabei wie folgt:

Vermischt man eine erstarrungsfähige, für Säureerzeugung geeignete Nährmasse mit sehr feiner, geschlemmter Kreide und giesst die gut gekochte Masse in eine sterilisirte Glasdose, so entsteht nach dem Erstarren ein Nährboden (*kge*, s. Figur), welcher gänzlich undurchsichtig und milchweiss gefärbt ist. Je nach Wunsch und nach Umständen kann man für die Erstarrung Gelatine, Agar oder Kieselgallerte verwenden [1]). Bringt man darauf einen Tropfen irgend einer Säure, welche ein lösliches Kalksalz erzeugt, z. B. Milchsäure, so sieht man ein vollständig durchsichtiges Diffusionsfeld entstehen, welches sich so lange ausdehnt, bis die Säure nahezu [2]) durch die Kreide neutralisirt ist, so dass die Mittellinie des circularen Feldes offenbar ein ungefähres Maass für die Quantität der verwendeten Säure ist.

Enthält die Masse ausser Kreide auch noch die für das Wachsthum der zu untersuchenden Organismen nothwendigen Nährstoffe, so können z. B. säurebildende Bakterienkolonien darauf den nämlichen Effekt hervorbringen wie ein Tropfen freier Säure. Als Beispiel will ich das Verfahren angeben, um Milchsäurebakterien und Essigfermente in einer gährenden Maische nachzuweisen und zu isoliren.

Die Erfahrung lehrt, dass diese Bakterien gut wachsen auf Hefewasser-Glukosegelatine und dass dieselben ihre Nährgelatine nicht verflüssigen. Die Nährmasse wird nun derweise angefertigt, dass 20 g [Hefe in 100 ccm Leitungswasser gekocht,

[1]) Ueber den Gebrauch von Kieselgallerte für bakteriologische Zwecke werde ich bei einer anderen Gelegenheit berichten. (Zu vergl. die inzwischen erschienene Abhandlung von Winogradsky, Ann. d. l'Institut Pasteur. T. V. 1891. pag. 92.)

[2]) Eine absolute Neutralisation findet nicht statt.

8 g] Gelatine (oder $^3/_4$ g Agar) und 5 bis 10 g Glukose zugesetzt werden. Nach neuem Kochen wird sorgfältig filtrirt und man erhält eine vollständig durchsichtige, schwach gelbliche Masse, welche auch beim Erstarren glasklar bleibt. Daran werden nun einige Tropfen einer Aufschlemmung reiner Kreide in Wasser gegeben bis zur gänzlichen Trübung, selbst in einer Schicht, welche ca. 1 mm dick ist. Nach Ausguss in eine Glasdose kann der Versuch anfangen.

Hierzu wird ein Tropfen der rohen, gährenden Maische in ein Kölbchen mit gekochtem Wasser vertheilt und nach tüchtigem Umschütteln wird dieses infizirte Wasser über den Kreideboden gegossen und sofort durch Abgiessen entfernt. Es haftet dabei eine sehr dünne Wasserschicht an der Gelatineoberfläche, derweise, dass pro 1 ccm Gelatine 3,3 cmm Flüssigkeit als Benetzung zurückbleibt. Bald saugt die Gelatine (oder der Agar) das Benetzungswasser auf und die lebenden Keime bleiben an der Oberfläche zurück.

Die Dose (s. Fig.) wird nun auf einen schwach geheizten Tisch oder auf den Boden eines Kulturkastens, dessen Boden-Temperatur diejenige des Innenraumes desselben etwas übersteigt, den Deckel *(gd)* nach unten, gestellt und einige Tage sich selbst überlassen [1]). Hefe und Bakterien [2]) fangen bald an zu Kolonien *(s, s', k)* auszuwachsen und, so weit dieselben Säure erzeugen *(s, s')*, entstehen durchsichtige Diffusionsfelder *(ds)*, welche sich Tage, selbst Wochen und Monate lang ausdehnen können. Bei richtiger Verdünnung des Aussaatmaterials, wodurch die Kolonieen in geeigneten Entfernungen von einander zu liegen kommen, entstehen auf die beschriebene Weise sehr elegante und lehrreiche Präparate, welche, da sie eine quantitative Schätzung erlauben, zu einer Reihe von Bemerkungen Veranlassung geben, die man bei anderen Untersuchungsmethoden übersieht. Andererseits muss man bezüglich der qualitativen Beurtheilung der Resultate vorsichtig sein.

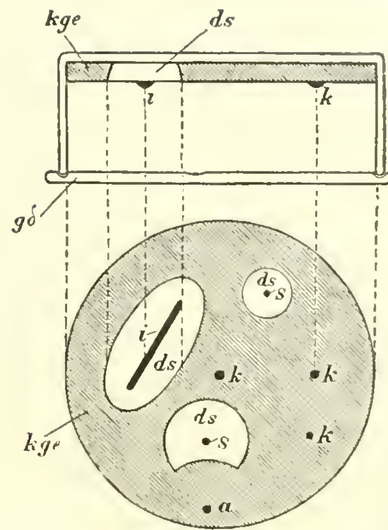
In ersterer Hinsicht will ich darauf hinweisen, dass das Verfahren sehr empfindlich ist, selbst die Bernsteinsäurebildung seitens der Hefekolonien sichtbar zu machen im Stande ist, und leicht erlaubt, diejenigen Varietäten der Milchsäurefermente, welche viel Säure erzeugen, sofort von den schwächeren zu unterscheiden.

Bezüglich der qualitativen Seite des Vorganges kann man natürlich aus einem einzelnen Versuche mit dem unbewaffneten Auge nichts lehren. So erzeugen die Essigbakterien aus der Glukose eine ganz andere Säure, wie die Milchsäurefermente, nämlich Glukonsäure ($C_6H_{12}O_7$), welche aber, eben wie die Milchsäure, ein lösliches Kalksalz erzeugt. Da nun auch die Kolonieen der Essigfermente äusserlich denjenigen der Milchsäurebakterien ähnlich sind, lässt sich die Differenz ohne Mikroskop nicht sehen. Allein, selbst wenn man dieses Instrument zu Hülfe zieht, lassen sich gewisse Milchsäurefermente, welche in industriellen Gährungen vorkommen, nicht sofort von den Essigbakterien unterscheiden. Dieses gilt nämlich von den zahlreichen

---

[1]) Wie ich das schon anderwärts sagte, ist diese Aufstellung der Gelatinekulturen sehr zu empfehlen, denn dadurch, dass der Deckel am wärmsten, die nach oben ragende Gelatineschicht kälter ist, kann sich durchaus kein Wasserdunst bilden. Ueberdies ist die Chance für Infektion in die Glasdose sehr gering, da selbst die leichtesten eingedrungenen Schimmelsporen unten auf dem Deckel liegen bleiben.

[2]) In gut geleiteten Brennereien und Hefefabriken findet man durchaus keine Schimmelarten in gährenden Maischen, wenn man wenigstens die sogenannte Pasteurianushefe nicht zu den Schimmelpilzen rechnen will.



Kreide-Gelatine-Boden (*kge*) in einer Glasdose mit nach unten gekehrtem Deckel (*gd*), im Durchschnitt und in Projektion. *k* Kolonieen, welche keine Säure erzeugen. *s* Säurebildende Kolonieen. *ds* Durchsichtiges Säurediffusionsfeld im trüben Kreideboden. *a* Alkalibildende Kolonie, welche das Saurediffusionsfeld einer säureerzeugenden Kolonie (*s'*) theilweise neutralisirt. *i* Impfstich einer säureerzeugenden Mikrobe mit elliptischem Säurediffusionsfeld.

Varietäten der diplokokkenartigen Milchsäurebakterien, welche denjenigen Forschern, die sich mit der Untersuchung saurer Milchpräparate beschäftigt haben, wohl bekannt sind, auch in den Spiritusfabriken vorkommen und welche den Essigfermenten zum Verwechseln ähnlich sind[1]).

Hat man demnach, wie in unserem Beispiele, eine Mischung vor sich, worin solche Milchsäure- und Essigfermente zu gleicher Zeit vorkommen, so lassen sich dieselben nicht in allen Fällen vermittelst des Kreidebodens unterscheiden. Dessenungeachtet bleibt man, wenn, wie wir bei der Untersuchung einer gährenden Maische voraussetzen können, Hefekolonien nah oder fern von den Säure erzeugenden Bakterien getrennt liegen, in jener Beziehung nicht lange im Unsicheren. Denn sobald die ersteren anfangen, Alkohol zu produziren, so diffundirt dieser Körper den Bakterienkolonien entgegen, erfährt dabei keine Umwandlung durch die Milchsäurebakterien, wird aber durch die Essigfermente in die schnell diffundirende Essigsäure verwandelt, welche von da an beiträgt zur Vergrösserung der Glukonsäurediffusionsfelder, während die Milchsäurefelder keine Zunahme ihrer Ausdehnungsschnelligkeit erfahren. Die Differenz wird allmählich grösser, so dass eine einzelne Aussaat, einfach durch wiederholte Betrachtung, schliesslich Sicherheit gibt über die qualitative Frage, welche säurebildenden Kolonien zu Milchsäurefermenten und welche anderen zu Essigfermenten gehören.

Im besprochenen Beispiele wurde vorausgesetzt, dass Glukose als Quelle für die Säureerzeugung dargeboten wurde. Offenbar kann dieser Zucker durch andere Zuckerarten, wie Milchzucker, Rohrzucker, Maltose, Laevulose, Mannit etc. ersetzt werden, und man erhält dadurch nachhaltige qualitative Reaktion, wodurch es z. B. gelingt, unter den stäbchenförmigen Milchsäurefermenten der Industrie, welche sich durchaus nicht alle auf identische Weise bezüglich der verschiedenen genannten Zuckerarten verhalten, gute Unterscheidungsmerkmale zu finden.

---

[1]) Wenn Haeckel in seinen interessanten »Plankton-Studien« (Jena 1890. pag. 100) Hensen vorwirft, es sei unrichtig, die »wirkliche Species als einen physiologischen Begriff« aufzufassen, so kann ich ihm darin nicht beistimmen, und ich glaube, dass dieser angesehene Forscher in diesem Falle den jüngsten Spross der Systematik, nämlich die Bakteriologie, vollständig aus dem Auge verliert. Dagegen muss ich auf Grund meiner eigenen Erfahrung Haeckel folgen, wenn er Hensen gegenüber behauptet (pag. 101): »Je intensiver das Studium der individuellen Variation, desto unmöglicher wird die Unterscheidung wirklicher Species.« Hierdurch wird aber nur gesagt, dass die physiologischen Charaktere nicht weniger veränderlich sind, wie die morphologischen.

2. Boden mit den Karbonaten von Magnesium, Barium, Strontium, Mangan, Zink etc.

Eine andere Erweiterung erfährt unsere Untersuchungsmethode dadurch, dass die Kreide durch irgend ein anderes säurelösliches, nicht giftiges Karbonat ersetzt wird. Besonders die Karbonate von Barium, Magnesium, Mangan und Zink habe ich näher untersucht und für bestimmte Zwecke nützlich gefunden. Ich verfahre dabei so, dass ich die bezüglichen Nährböden ebenso wie oben anfertige. Die zu untersuchenden Organismen werden dann als Impfstriche auf die Oberfläche der Gelatineschicht abgezogen, und, falls die Säure im Stande ist, das dargebotene Karbonat zu lösen, entstehen wie oben elliptische Diffusionsfiguren, deren Achsen mit dem Impfstriche zusammenfallen, derweise, dass die Enden der letzteren die Brennpunkte bezeichnen. Zweifelhafte Arten, auf einzelnen dieser Metallböden untersucht, lassen bei einiger praktischer Uebung nicht lange bezüglich ihrer wahren Natur im Unsicheren. Solche Versuche sind beiläufig auch interessant wegen der Schönheit der wie mathematisch konstruirten Diffusionsfiguren [1]).

Besonders das Zinkkarbonat eignet sich zur leichten Erkennung gewisser Formen. So sind die Milchsäurebakterien diesem Salze gegenüber ziemlich empfindlich, besonders bezüglich des Wachthums, während die Funktion der Säurebildung in den erwachsenen Stäbchen weniger durch dieses Metall beeinflusst wird. Die Essigfermente sind dagegen auch betreffs des Wachsthums nicht empfindlich für die bei unseren Versuchen in Betracht kommenden Quantitäten des Metallsalzes. Endlich wird die von mir aufgefundene Essigätherhefe, welche auch viel freie Säure bilden kann, in ihrem Wachsthum entschieden durch die Gegenwart eines Zinksalzes begünstigt. Nach dem Vorhergehenden brauche ich nun wohl nicht zu sagen, was man zu sehen bekommt, wenn Impfstriche von Milchsäure- und Essigsäurefermenten neben Essigätherhefe, auf einen Zinkkarbonatboden gezogen, sich selbst überlassen bleiben; nur will ich noch betonen, dass das Zink offenbar ein gutes Mittel an die Hand gibt, um die wachsenden Essig- und Milchsäurebakterien von einander zu unterscheiden.

Meine Methode eignet sich noch für Anwendungen in einigen anderen Hinsichten. Darüber an dieser Stelle noch folgendes.

3. Erkennung der Alkalibildung vermittelst des Kreidebodens.

Auf die Möglichkeit, das Maass der Alkaliabsonderung vermittelst der Kreidemethode zu schätzen, wurde ich aufmerksam bei der genauen Betrachtung einer auf Bier gewachsenen Kahmhaut, welche in bekannter Weise auf einem Hefewasser-Glukose-Kreide-Gelatineboden ausgesät war. Es fand sich darin nämlich nicht selten ein gelblich-brauner Micrococcus, welcher zu einer sehr augenfälligen Formveränderung in den benachbarten Säurediffusionsfeldern Veranlassung gab, indem diese nicht circular blieben, sondern polyedrische Gestalt annahmen, mit den Mikrokokkenkolonien zugekehrten Seiten. Bald ergab sich die Absonderung einer al-

[1]) Die Präparate eignen sich ausgezeichnet zur Herstellung von Dauer- und Demonstrationspräparaten. Sie werden dann mit einer sehr verdünnten Sublimatlösung übergossen und eingetrocknet.

kalischen Substanz als die Ursache der Erscheinung, und ein Mittel war gefunden, um willkürliche Bakterienarten, soweit deren Kulturen auf einem Boden, welcher für Säurebildung geeignet, also zuckerhaltig ist, wachsen können, auf das Maass ihrer Alkalierzeugung zu prüfen. Es werden dazu einfach auf einen Hefewasser-Glukose-Kreideboden rechtlinige Impfstriche gezogen irgend einer säurebildenden Bakterie, z. B. eines Milchsäurefermentes, oder besser noch, es werden davon punktförmige Massen auf den Kreideboden gebracht. Im ersteren Falle entstehen dadurch bald elliptische, im zweiten circuläre (*ds*) durchsichtige Diffusionsfelder. Hat man aber die auf ihre Alkaliabsonderung zu untersuchenden Arten neben den säurebildenden Arten abgestrichen, so neutralisirt das Alkali derselben theilweise die Säure, und dann erscheint die oben genannte Formänderung im durchsichtigen Diffusionsfelde.

Qualitative und quantitative mikrobiochemische Analyse.

Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde, Jena, X. Band, 1891, S. 723—727.

Unter »mikrobiochemische Analyse« verstehe ich den Gebrauch von Mikroorganismen für Nachweis und Dosirung bestimmter Stoffe.

Zweck derselben ist, Aufschluss zu erhalten über die Natur organischer Flüssigkeiten, von den Extrakten von Pflanzentheilen, von den Produkten von enzymatischen Umwandlungsprozessen; ferner über diejenigen Bestandteile sehr verdünnter Lösungen im Allgemeinen, welche für Mikrobienwachsthum geeignet sind. Das Verfahren beansprucht nichts Weiteres zu sein, als ein Hülfsmittel bei physiologisch-chemischen Untersuchungen; nur mit diesen zusammen ist es werthvoll und verbrauchbar.

Für die qualitative Analyse ist das auxanographische Verfahren mit Vortheil anwendbar.

Das Prinzip der quantitativen Methode beruht auf der Ueberführung der zu bestimmenden gelösten Körper in Mikrobiensubstanz und auf der quantitativen Bestimmung der letzteren durch Kolonienzählung. Die Ausführung der Versuche muss mit Reinkulturen geschehen. Wünscht man dabei zu wahren Gewichtsverhältnissen zu gelangen, so muss die chemische Zusammenstellung der verwendeten Mikrobienarten bekannt sein. Liegt z. B. Hefe vor, so kann man ziemlich genaue Zahlen aufstellen, welche jedoch bei dem den verschiedenen Nährböden entsprechenden ungleichen Gehalte der Hefezellen an Wasser, Stickstoff und Glycogen natürlich nur als annähernd betrachtet werden müssen.

Dagegen kann das relative Verhältniss zwischen den Zahlen der z. B. aus zwei Wasserproben zu kultivirenden Hefezellen bei richtiger Versuchsanstellung zu einer sehr genauen Bestimmung des relativen Gehaltes an Mikrobiennährstoffen in den untersuchten Proben Veranlassung geben, und das ist in den gewöhnlichen Fällen zureichend.

Bei dem Gebrauch von Bakterien, deren chemische Zusammensetzung noch unvollkommener bekannt ist wie diejenige von Hefe, kann die gefundene Gesammtzahl der organischen Stoffe nicht weiter zergliedert werden.

1. Quantitative Bestimmung der organischen Stoffe in verdünnten Lösungen und in Trinkwasser durch Mikrobienwachsthum.

Die klare Lösung oder das zu untersuchende filtrirte Wasser wird durch Sieden oder auf irgend eine andere Weise durch Hitze sterilisirt. In ein bestimmtes Volumen

wird dann eine Spur irgend einer, je nach Umständen kleinen oder sehr kleinen, nicht in Ketten wachsenden, sondern nach jeder Theilung sofort frei kommenden Bakterie ausgesät, und wenn der Höhepunkt der Vermehrung erreicht ist, durch Kolonienzählung in irgend einem geeigneten festen Substrate der als Bakteriensubstanz aus der Lösung abgesetzte Gehalt an organischen Nährstoffen festgestellt.

Verwendet man dabei eine Bakterienart, welche für die Vermehrung eine gesonderte Stickstoff- und Kohlenstoffquelle verlangt, so wird, bei Gegenwart einer zureichenden Quantität Phosphate, von den beiden Körpergruppen so viel als Bakteriensubstanz festgelegt, wie dem plastischen Aequivalent dieser Stoffe entspricht [1]; der neben diesem Aequivalent in Ueberschuss vorhandene Theil, sei es der Stickstoffverbindungen, sei es der Kohlenstoffsubstanzen, bleibt unverwendet zurück.

Wird dagegen der zu analysirenden Flüssigkeit eine Mikrobienart zugefügt, welche sich nur ausschliesslich von stickstoffhaltigen Stoffen ernährt, so erhält man Einsicht in das quantitative Mass dieser Körpergruppe allein, und zwar soweit dieselbe für Mikrobienvermehrung tauglich ist. Echte Peptonbakterien werden keine Ammonsalze und ebensowenig Nitrite und Nitrate anzeigen.

Als sehr geeignet für diese Untersuchung haben sich die sogenannten Wasserbakterien ergeben, das heisst diejenigen Formen, welche durch ihre ausserordentliche Kleinheit und durch einen höchst merkwürdigen Ernährungsmechanismus selbst in destillirtem Wasser zu prodigiösen Zahlen sich vermehren können. Dieselben müssen zum Zwecke des Zählens in sehr verdünnte feste Substrate ausgesät werden, z. B. in 10% Lösungen reiner Gelatine in Leitungswasser. Die Hauptschwierigkeit bei der Ausführung der Versuche ist die Erhaltung einer konstanten Temperatur, ferner die vollständige Fernhaltung flüchtiger organischer Körper, sowie schädlicher Stoffe von den Kulturkolben.

2. Quantitative Bestimmung des Gesammtstickstoffes.

Die Hauptformen, worin der Stickstoff im Wasser und in den meisten physiologisch wichtigeren Flüssigkeiten gefunden wird, nämlich als Eiweiss, Pepton, Amid, Ammonsalz, Nitrit und Nitrat, sind alle der biochemischen Bestimmung zugänglich, das heisst, es gibt bestimmte Mikrobien, welche diese Körper als Stickstoffquellen verwenden können. Wie sich in dieser Beziehung die Cyanverbindungen verhalten, das heisst, ob es überhaupt lebende Wesen gibt, welche dieselben, zusammen mit einer Kohlenstoffquelle, assimiliren können, ist mir noch unbekannt. Zahlreiche Formen, welche ich untersuchte, konnten es bestimmt nicht. Stoffe wie Tyrosin, Leucin und Ureum werden dagegen durch viele Arten, bei Gegenwart eines Kohlehydrates, vollständig assimilirt.

Die Methode ist eine ausserordentlich empfindliche. Ja die Empfindlichkeit ist eine so grosse, das es empfehlenswerth ist, Organismen zu gebrauchen, welche nicht allzu klein sind und desshalb bei der Herstellung jedes individuellen Keimes eine nicht excessiv kleine Stickstoffmenge absorbiren. Es sind besonders gewisse Hefe-

---

[1]) Ueber den Ausdruck »plastisches Aequivalent« findet man Näheres in meinem Aufsatze über die Ernährung der Leuchtbakterien, Archives Néerlandaises, T. 24. pag. 393. 1890.

arten[1]), welche sich deshalb sehr für die biochemische Analyse empfehlen. Bei dem Gebrauch von Hefen muss man jedoch durch das Mikroskop sicher festgestellt haben, dass die Zellen gänzlich lose herum schwimmen; sind dieselben noch zu Verbänden vereinigt, so ist natürlich Kolonienzählung gänzlich werthlos. Ferner muss hervorgehoben werden, dass die gewöhnlichen Hefeformen Peptone sehr leicht, Eiweisskörper dagegen nicht oder nur sehr unvollkommen assimiliren, so dass diese unbenützt in den Flüssigkeiten zurückbleiben. Nitrite werden, so viel mir bekannt, nur durch das Nitratferment verbraucht, und dieses Ferment ist wegen des allzu langsamen Wachsthums für die Analyse nicht zu verwenden. Es ist aber leicht, ohne Einführung irgend einer Fehlerquelle, etwa vorhandenes Nitrit zuvor durch eine Spur Permanganat zu oxydiren. Das dabei entstehende Nitrat kann durch gewisse Hefen assimilirt werden.

Das hohe Phosphatbedürfnis der Hefen wird in manchen Fällen die Zufügung einer Spur Kaliumbiphosphats an die zu untersuchende Flüssigkeit erheischen.

Ist die Stickstoffmenge eine äusserst geringe, handelt es sich z. B. um die Bestimmung dieses Körpers in destillirtem Wasser oder in den Verunreinigungen, welchen Rohrzucker oder Glykose anhängen, so ist es empfehlenswerth, gewisse Bakterienarten, welche sich leicht vermehren und ein nur geringes Stickstoffbedürfniss haben, für die Analyse zu verwenden. Bei der Aussaat für das Kolonienzählen muss dann aber mit grösster Vorsicht vorgegangen werden, denn die verschiedenen individuellen Keime verhalten sich einer bestimmten Konzentration der Nährstoffe gegenüber nicht alle gleich, und zwar in der Weise, dass die älteren Keime, in konzentrirteren Nährmassen, worin die jüngeren Keime sehr gut zu Kolonien auswachsen, nicht alle zur Entwicklung gelangen [2]).

Man hat jedoch für solche Versuche eine so reiche Auswahl von Formen, besonders wenn man die in Wasser oder die neben dem Nitrit- und Nitratferment bei Nitrifikationsversuchen auftretenden Arten anwendet, dass sich vielleicht die genannte, durch das Alter der Keime bedingte Schwierigkeit bei weiterer Ausbildung des Verfahrens vollständig wird beseitigen lassen. Ich erwarte dieses besonders deshalb, weil ich viel besser übereinstimmende Zahlen erhielt, als ich eine von mir als B. nitrosophilus bezeichnete Art verwendete, wie mit den ebenfalls an verdünnte Nährlösungen adaptirten Papilionaceenbakterien.

Auch muss betont werden, dass es für die Genauigkeit des Versuches wichtig ist, wenn die individuellen Keime gleich gross sind. Auch dieses ist bei dem stäbchenförmigen B. nitrosophilus viel mehr der Fall wie bei den Wurzelbakterien der Papilionaceen, welche in den Kulturen als Stäbchen, Sterne, Bakteroide und sehr kleine Schwärmer auftreten.

Auf die Möglichkeit, die Phosphate in Wasser durch die biochemische Analyse quantitativ zu bestimmen, habe ich meine Aufmerksamkeit noch nicht gerichtet. Meine auxanographischen Versuche haben mich überzeugt, dass diese ebenso gut ausführbar erscheint wie die Stickstoffbestimmung.

---

[1]) Das Wort »Hefe« gebrauche ich hier im weitesten, morphologischen Sinne, und verstehe darunter auch die rothen Hefen, welche gar nicht verwandt sind mit der Alkoholhefe.

[2]) Diese Erklärung der beobachteten Thatsache geht aus den vergleichenden Versuchen mit jungen und alten Kulturen, welche für die Aussaaten gebraucht werden, hervor.

Dagegen erachte ich die Möglichkeit des Nachweises von Kalium als fraglich, diejenige von Schwefel, Chlor, Calcium und Magnesium als nicht ausführbar.

3. Hauptschwierigkeiten des Verfahrens.

Diejenigen Forscher, welche sich mit der Bestimmung des Zuckergehaltes organischer Lösungen durch Gährung beschäftigt haben und die grossen Abweichungen kennen, welche dabei in der entwickelten Kohlensäuremenge auftreten, werden vielleicht die von mir vorgeschlagene physiologische Methode als eine a priori sehr ungenaue zu bezeichnen sich veranlasst fühlen.

Gegen das gewöhnlich angewendete Gährungsverfahren habe ich aber viel einzuwenden. An dieser Stelle genügt es zu betonen, dass aus der Ungleichheit der Kohlensäurequantitäten bei den üblichen Gährungsversuchen, welche mit roher Press- oder Bierhefe angestellt werden, durchaus nicht auf eine Ungleichheit in der Anzahl der neugebildeten Hefezellen geschlossen werden kann, wenn nach meinem Verfahren gearbeitet wird, und ich behaupte, dass es durch das Zählen der Zellen, welche bei übrigens gleichen Versuchsbedingungen entstehen, auch möglich ist, eine sehr genaue Einsicht in die quantitativen Zuckerverhältnisse verschiedener Nährlösungen zu erreichen. Es ist dabei an allererster Stelle nöthig, den Stickstoff immer in derselben Form — z. B. bei den Mykodermen als Ammonverbindung, bei den Maltosehefen als Pepton [1]) — in die Flüssigkeiten, welche auf Zucker untersucht werden sollen, darzureichen. Ferner muss die für die Aussaat verwendete Zahl, sowie die Qualität [2]) der Zellen nahezu identisch sein, was leicht durch Abmessen geschehen kann, wenn man zuvor die Zellen in Wasser aufschüttelt, und endlich muss der Zutritt des Sauerstoffs in die Nährlösungen auf identische Weise stattfinden. Dieses letztere lässt sich sehr vollkommen erreichen, wenn die in den Versuchskölbchen oberhalb der Kulturflüssigkeit befindliche Luft durch eine Druck- oder Saugvorrichtung sehr langsam, aber fortwährend erneuert wird. Die Schichten in den Kulturkölbchen sollen dabei sehr dünn, die zugeführte Luft filtrirt und nicht zu trocken sein.

Als von besonderer Wichtigkeit bezeichnete ich die chemische Bindungsform, worin der Stickstoff dargereicht wird. In dieser Beziehung kann ich nicht auf Einzelheiten eingehen und betone nur, dass identische Zuckermengen sehr verschiedene Zahlen von Hefezellen erzeugen mit identischen dargebotenen Stickstoffmengen, je nachdem die letzteren als Pepton, Amid oder Ammoniaksalze zur Verfügung stehen. Peptone erweisen sich, z. B. bei der Vermehrung der Maltosehefen am produktivsten, bei den Mykodermen dagegen nicht etc.

Aehnliche Verhältnisse wie die hier beschriebenen werden gewiss auch für alle anderen Mikrobien als Fehlerquellen des Verfahrens bestehen. Dieselben sind jedoch bei den nicht gährenden Arten von geringerer Bedeutung, und bei der Aufstellung von nur relativen Werthen jedenfalls kein ernstes Hinderniss.

---

[1]) Die Zahl der Hefezellen, welche aus Pepton mit Nährsalzen allein entsteht, ist eine äusserst kleine, und kann, wenn der Zucker in nicht allzu geringer Quantiät vorliegt, vernachlässigt werden.

[2]) Unter Qualität verstehe ich hier die, besonders durch das Alter bestimmte Quantität der in den Zellen vorhandenen Reservestoffe, wie Glykogen, Protoplasma und Extraktivkörper.

Auf die nicht flüchtigen löslichen Stoffwechselprodukte der Mikrobien glaube ich ungefähr die nämlichen Betrachtungen anwenden zu können, wie auf die Athmungs- und Gährungskohlensäure der Hefe, und ich meine, dass auch dadurch das Erreichen vollständiger Genauigkeit zwar vereitelt werden muss, allein, dass die Grösse der sich daraus ergebenden Toleranz die Methode nicht erschüttert. In anderen Aufsätzen werde ich durch Beispiele das hier Gesagte näher begründen.

Zur Ernährungsphysiologie des Kahmpilzes[1]).

Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde, Jena, XI. Band, 1892, S. 68–75.

1. Die Ernährung des Kahmpilzes mit Kohlehydraten.

Abgesehen von den Phosphaten und den übrigen Aschenbestandtheilen ist die Ernährung bei den verschiedenartigsten Hefearten eine dualistische. Hier werden nämlich für die vollständige Aeusserung aller Lebenserscheinungen eine gesonderte Kohlenstoff- und Stickstoffquelle gefordert.

In Bezug auf die für Hefe- und Kahmpilze nothwendigen Stickstoffquellen muss ich mich an dieser Stelle kurz fassen. Es genügt hervorzuheben, dass Wein- und Bierhefe auf Amide, wie z. B. Asparagin (nicht aber Ureum), und ganz besonders auf Peptone angewiesen sind; Ammonsalze werden durch diese Hefearten nur sehr schwierig und langsam assimilirt. Der Kahmpilz kann dagegen ebenso gut, ja noch besser mit Ammonsalz ernährt werden, wie mit Amiden und Peptonen. Auch Ureum ist dafür ausgezeichnet. Nitrate sind nur für vereinzelte, Nitrite für keine dieser Organismen Stickstoffquellen. Diese Körper bleiben in Kontakt z. B. mit Maltosehefen oder mit Kahmpilz, wie es scheint, unter allen Umständen unzersetzt[2]).

Auf fernere Einzelheiten in Bezug auf die Stickstoffernährung muss ich hier verzichten, wünsche aber zu betonen, dass der eben angeführte Gegensatz zwischen Kahmpilze einerseits und Bier- und Weinhefe andererseits bezüglich deren Verhalten zu Ammonsalzen, nicht nur physiologisch, sondern auch für methodische Zwecke wichtig ist.

In Bezug auf die Kohlenstoffquellen müssen wir etwas ausführlicher sein.

Die beste, und für einige Spezies wohl die alleinige Kohlenstoffnahrung, sind die Zuckerarten, worauf der Name Saccharomyces hindeutet. Verfolgt man die Sache im Einzelnen, so findet man, dass die verschiedenen Saccharomyceten sich den verschiedenen Zuckern gegenüber so verschieden verhalten, dass darauf eine sehr

---

[1]) Ich gebrauche hier den Namen Kahmpilz in der nämlichen Fassung, welche ursprünglich von Reess gegeben wurde (Alkoholgährungspilze. Leipzig 1870. pag. 85). Es gehören dazu eine Reihe morphologischer Varietäten, welche sich aber, bei genauer Untersuchung, als nicht vollständig konstant ergeben, und — was hier Hauptsache ist — sich in Bezug auf die Zerlegung der verschiedenen Zuckerarten identisch verhalten. Dieselben lassen sich sehr leicht an der Form ihrer Kolonieen auf (nicht in) Nährgelatine unterscheiden.

[2]) Die gegentheiligen Angaben in der Litteratur sind fehlerhaft. Mir ist nur eine Hefeart bekannt geworden, welche ihren Stickstoffbedarf Nitraten zu entlehnen vermag, nämlich die Essigätherhefe.

gute physiologische Eintheilung der Gattung gegründet werden kann [1]). Die folgende kleine Tabelle, worin ich nur einige der interessantesten Hefearten und die wichtigsten Zuckersorten, sowie Glycerin und Dextrin, aufgenommen habe, mag dieses versinnlichen.

Saccharomycesarten	Maltose	Glukose [7])	Saccharose	Lactose	Dextrin	Glycerin
S. ellipsoideus [2])	+	+	+ *i* [8])	—	—	—
S. cerevisiae [3])	+	+	+ *i*	—	—	—
S. Pastorianus Reess . .	+	+	+	—	+	—
S. fragrans [4])	—	+	+	—	—	—
S. Kefyr [5])	—	+	+ *i*	+	—	—
S. Mycoderma	—	+	—	—	—	+
S. acetaethylicus [6]) . . .	+	+	+ *i*	—	—	+

In vorstehender Tabelle bedeutet das Zeichen +, dass der betreffende Zucker assimilirt wird und für das Wachsthum verwendet werden kann; das Zeichen —, dass der Zucker durch die Hefe nicht zersetzt wird. Der Buchstabe *i* gibt an, dass der Zucker vor der Aufnahme invertirt wird. Durch die Assimilationsmöglichkeit dieser Körper ist die Gährungsfähigkeit derselben zwar meistens, jedoch durchaus nicht immer, gegeben. Da die Gährungsfunktion, das heisst in diesem Falle, die Spaltung in Alkohol und Kohlensäure ohne einen adäquaten Sauerstoffverbrauch, bei manchen Arten nur unter bestimmten Umständen, worauf wir unten noch zurückkommen, bemerkbar ist, so ist darauf in der gegebenen Tabelle keine Rücksicht genommen. Unter Assimilationsfähigkeit, und ich hebe das noch besonders hervor, haben wir nicht eine undeutliche oder zweifelhafte Erscheinung zu verstehen, sondern es handelt sich dabei, bei geeigneter Versuchsanordnung, um eine ebenso sichere und scharfe Erscheinung, wie bei den besten chemischen Reaktionen. Auffallend und für methodische Zwecke sehr wichtig ist das negative Verhalten des Kahmpilzes den verschiedenen Kohlehydraten gegenüber, nur Glukose, Lävulose und Invertzucker werden von die-

[1]) In Bezug auf die Ernährung mit Kohlehydraten kann man die Gattung Saccharomyces im weitesten Umfange in die folgenden Abtheilungen spalten:
α) Glucomyces. Beispiel: S. Mycoderma. β) Maltomyces. Beispiel: S. cerevisiae. γ) Lactomyces. Beispiel: S. Kefyr. δ) Raffinomyces. Beispiel: S. fragrans. ε) Dextrinomyces. Beispiel: S. Pastorianus. ζ) Polysaccharomyces. Beispiel: S. acetaethylicus.

Die Bedeutung der hier gewählten Namen ergibt sich aus obenstehender Tabelle. Mit Ausnahme von Glukose, Laevulose und Invertzucker, welche von allen Hefearten assimilirt werden, gibt es für jede Zuckerart Hefeformen, welche sich damit nicht ernähren können.

[2]) Wein- oder Presshefe.

[3]) Bierhefe.

[4]) S. Pastorianus Pasteur. Ich wählte den Namen fragrans wegen der lieblichen Ester, welche diese Art, neben Alkohol, aus Glukose erzeugen kann.

[5]) Hefe der Kefirkörner.

[6]) Essigätherhefe.

[7]) Lävulose und Invertzucker verhalten sich wie Glukose.

[8]) Der Buchstabe *i* bedeutet, dass Rohrzucker invertirt wird.

ser Art zum Wachsthum verwendet und Maltose bleibt vollständig unzersetzt. Dass auch Rohrzucker nicht zerlegt wird, beruht, wenigstens in erster Linie, auf dem Fehlen eines invertirenden Enzyms. Diese Thatsachen, welche mir schon 1886 bekannt waren, veranlassten mich, Maltose- und Rohrzuckerlösungen, unter Zufügung einer Spur Ammonphosphat, von den als Verunreinigung anhängenden Zuckerarten, wie Glukose und Invertzucker, durch Reinkultur des Kahmpilzes zu befreien. Später entwickelte sich daraus ein gutes Verfahren, um die Erzeugung gewisser Enzyme, wie Invertin und Glukose, durch Mikrobien zu studiren, sowie die noch immer unvollständig beantwortete Frage, inwieweit Pankreasdiastase, Ptyalin, Malzdiastase und andere Diastasepräparate, neben Maltose auch Glukose erzeugen, zu erledigen. Es war eben diese Erkenntnis, welche mich zum Schreiben des vorliegenden Aufsatzes veranlasste. Zur richtigen Beurtheilung der Versuche, welche zu diesem Zwecke angestellt werden können, müssen jedoch die die Ernährungsphysiologie des Kahmpilzes betreffenden Umstände genau bekannt sein. Die Versuche selbst werden in einem anderen Aufsatze besprochen werden.

2. Ernährung des Kahmpilzes mit anderen Kohlenstoffquellen, wie Kohlehydraten.

Auf dem weiten Gebiete der Anpassungen der Mikrobien an gewisse Stoffe dürfte es kaum ein zweites Beispiel eines so ausgeprägten Abhängigkeitsverhältnisses einer Art zu den Exkretionsprodukten von ganz anderen Organismen geben, wie dasjenige des Kahmpilzes zu den Maltose- und Saccharosehefen. Muss es einerseits als eine Unvollkommenheit in der Organisation des Kahmpilzes betrachtet werden, dass Rohrzucker, Maltose und Milchzucker dafür sozusagen nicht existieren, so wird dieser Nachteil, wenn nicht aufgehoben, doch sehr verkleinert dadurch, dass Alkohol ein ausgezeichneter Nährstoff für den Kahmpilz ist [1]). Wissen wir nun noch dazu, dass auch Bernsteinsäure und Glycerin, obschon schwieriger wie Alkohol, als Nahrung fungiren, so wird obiger Ausspruch nicht übertrieben genannt werden können. Dabei ist die Anpassung aber nicht stehen geblieben, sondern unser Pilz hat es noch um einen sehr entscheidenden Schritt weiter gebracht. Die ausserordentlich allgemeine Verbreitung der Essigbakterien im Staube des Getreides [2]) bedingt die allgemein bekannte Leichtigkeit, womit Sauerteig [3]) und vergohrene Malzauszüge zur spontanen Essigsäurebildung gelangen. Dieses Vorkommen, sowie ihre Allgemeinheit im Staube der Luft bedingt die Säuerungsfähigkeit von Wein, Bier und anderen gegohrenen Flüssigkeiten. Da der Kahmpilz etwas weniger allgemein verbreitet ist, wie die Essigbakterien, muss er sich deshalb, in manchen Fällen, von seiner eigentlichen Hauptnahrung, dem Alkohol, beraubt finden. Hier begegnen wir aber der weiteren Adaption: die Essigsäure ist ein ausgezeichneter Nährstoff für den Kahmpilz [4]).

---

[1]) Methyl-, Propyl- und Butylalkohol, sowie die höheren Alkohole werden nicht durch den Kahmpilz assimilirt.

[2]) Ich spreche hier auf Grund vieler eigenen Versuche.

[3]) Die im Sauerteige gewünschten Organismen sind die Alkoholhefen. Die Milchsäurefermente sind darin nur insoweit nützlich, als dieselben durch ihre Milchsäureabsonderung Essig- und Fäulnissbakterien in ihrer Entwicklung beeinträchtigen.

[4]) Ameisensäure, Propionsäure, Buttersäure, sowie die höheren Fettsäuren werden durch den Kahmpilz nicht assimilirt.

Dieser Umstand, in Verbindung mit der Fähigkeit der Ammonsalze als Stickstoffquelle zu fungiren, veranlasst zu dem folgenden eleganten Versuch: Ein Becherglas mit einer verdünnten Lösung von Ammonacetat und etwas Kaliumbiphosphat wird der spontanen Infektion überlassen. Die meisten Schimmel- und Bakterienarten, Hefen und Protozoen finden darin keinen, der Kahmpilz dagegen einen vorzüglichen Nährboden. Deshalb entsteht in einigen Tagen eine geschlossene Haut des Kahmpilzes auf der Oberfläche der Flüssigkeit, welche sozusagen als eine Reinkultur betrachtet werden kann. Calciumacetat wird unter Absonderung von Calciumcarbonat zerlegt.

Eben wie der Kahmpilz an die Nebenprodukte der Alkoholgährung, nämlich an Bernsteinsäure und Glycerin, adaptiert ist, so ist er es auch an die bei der spontanen Essigbildung leicht entstehenden Zuckersäuren. Diese Körper bilden sich aus dem noch nicht der Alkoholgährung anheimgefallenen Theile des Zuckers, sei es Glukose, Maltose, Saccharose[1]) oder Laktose, dadurch, dass die Essigfermente den Sauerstoff direkt auf diese Körper übertragen, in Folge dessen eine chemische Addition stattzufinden scheint. Für den Kahmpilz ist dadurch der Zucker nicht verloren, im Gegenteil, Maltose, Laktose und Saccharose, welche an sich nicht assimilirbar sind, werden eben dadurch zu einem nützlichen Nährstoff für den Pilz.

Und hiermit schliesse ich meine kurze Uebersicht der stofflichen Anpassungen von Saccharomyces Mycoderma, welche ich besonders desshalb anführe, weil dadurch die Fähigkeit des Kahmpilzes für mikrobiochemische Zwecke, sowie die Fehlerquellen, welchen man dabei begegnen kann, sich gut beurtheilen lassen.

Diese letztere Gedankenlinie führt uns nun noch zur Betrachtung einer Erscheinung von gänzlich anderer Natur, nämlich auf die Umwandlung der Glukose in Alkohol und Kohlensäure durch den Kahmpilz selbst.

3. Der Kahmpilz als Gährungserreger.

Das Wort Gährung wird nach meiner Ansicht in vielen wissenschaftlichen Abhandlungen missbraucht. Anstatt sich die Mühe zu geben, für sich und andere zurecht zu legen, was sie darunter eigentlich verstehen, haben die Autoren nur zu oft die Gewohnheit, die Gährung als eine selbstverständliche Erscheinung aufzufassen, womit alle ihre Leser ganz genau bekannt sind. Finden sie dann, dass der Sauerstoff der Luft in gewissen Fällen die Lebenserscheinungen und damit auch die Gährung bei ihren Gährungserregern kräftig fördert, so glauben sie sich verpflichtet, Pasteur über seine Sauerstoffentziehungstheorie dieser Erscheinung tadeln zu müssen.

Inzwischen ist dasjenige, was eben Pasteur über die Theorie der Gährung gesagt hat, doch noch stets weitaus das Beste, wenn nicht das einzig Wissenschaftliche, was darüber bisher bekannt ist. Ich wiederhole, dass ich hier nur von der Theorie der Gährung spreche, denn neue Gährungserscheinungen sind nach Pasteur's Arbeiten nicht wenige bekannt geworden; zur Begründung einer besseren Theorie, als die von ihm gegebene, haben dieselben aber nicht beigetragen.

Pasteur's Hauptentdeckung lässt sich durch die zwei folgenden Sätze, welche auf die Bierhefe Bezug haben, wiedergeben.

1. Die Hefe kann in einem vollständig sauerstofffreien Medium wachsen und gähren.

---

[1]) Die Essigfermente invertiren Rohrzucker und Maltose nicht.

2. Nach einigen Zelltheilungen ist die Aufnahme neuen Sauerstoffs nothwendig, um Wachsthum und Gährung weiter zu ermöglichen.

Pasteur sagt sehr deutlich, dass die unter 1 angeführte Anaërobiose die Gegenwart einer festen Sauerstoffreserve in den Hefezellen voraussetzt. Als er dann später die Buttersäuregährung des Calciumlaktates auffand, wofür die unter 2 angegebene Nothwendigkeit einer Erneuerung der Sauerstoffreserve nicht nachgewiesen ist, hat er auf den zweiten Satz nur eine untergeordnete Bedeutung gelegt — ob mit Recht, das muss die Zukunft lehren —, dadurch aber die ziemlich verwickelten Verhältnisse nicht tiefer begründet oder aufgeklärt, besonders deshalb nicht, weil andere Forscher, eben wie Pasteur selbst, diese Gährung bisher nur als eine spontane, sehr capriciöse Erscheinung kennen lernten. Ich habe eine Reihe von Beobachtungen über eine andere, anscheinend vollkommen anaërobe Gährung anstellen können, nämlich die Butylalkoholgährung; ich hoffe darauf später zurückkommen zu können.

Ich darf nicht unterlassen, hervorzuheben, dass auch Pasteur selbst dann und wann in seinen Schriften in den vorher genannten Fehler verfällt, insoweit er seine eigene Gährungstheorie bisweilen nicht berücksichtigt. Wie kann es anders erklärt werden, dass er die Essigbildung mit der Gährung zusammenwirft, während ihm offenbar alles daran gelegen ist, zu zeigen, dass Gährung Leben ohne freien Sauerstoff ist.

Nach meiner Ansicht kann man sich aus der Sache, welche offenbar in einen Wortstreit ausläuft, nur dadurch retten, dass man für Gährung eine gute Definition aufsucht, welche jedermann annehmen kann, und dann weiter nur diejenigen Erscheinungen, welche in die Definition hineinpassen, als Gährung bezeichnet, und wenn sie das nicht thun, auf andere Weise systematisiert. Nun behaupte ich, dass »gähren« ein Wort des Volksmundes ist, wodurch die äussere Erscheinung der Gasentwicklung in einer flüssigen oder halbflüssigen Masse angegeben wird. Dass auch Pasteur, als er seine Gährungstheorie aufstellte, das Wort in diesem Sinne genommen hat, ist sicher, nur kann es bedauert werden, dass er das nicht deutlich gesagt hat, sondern eine Theorie zu binden, gesucht hat an einen vagen, nicht wissenschaftlich definirten Begriff. Kann man mir bis soweit beistimmen, so gebe ich als Definition für Gährung: Erzeugung von Spannkraft unter Abspaltung von Gas, und zwar von mehr Gas, als dem während und vor der Gährung aufgenommenen Sauerstoff entspricht.

Dass man durch diese Definition gebunden, nun fernerhin nicht sprechen kann von »Oxydationsgährung«, »Pigmentgährung« etc., das betrachte ich eben als einen Gewinn an Klarheit.

Pasteur's Hauptverdienst bezüglich der Gährungstheorie ist nach meiner Ansicht der Nachweis, dass die grosse, von ihm entdeckte Erscheinung der Anaërobiose, eben bei den Gährungserregern weitaus am klarsten hervortritt. Weshalb die Anaërobiose so vielfach mit Gasentwicklung zusammengeht, ist noch nicht aufgeklärt. Vielleicht ist es nur das Mittel, wodurch die Gährungserreger, welche ihre Funktion in Schlamm oder in Wasser ausführen, der freien Oberfläche und dadurch dem atmosphärischen Sauerstoff zugeführt werden, wodurch sie auf's Neue eine für spätere Gährung nothwendige feste Sauerstoffreserve anlegen können. Jedenfalls würde es dadurch deutlich werden, weshalb eben das leichteste Gas, nämlich der Wasserstoff, weitaus das verbreitetste gasförmige Gährungsprodukt ist, während doch durch die Excretion dieses Körpers der grösstmögliche Verlust an Energie zustande kommen

muss. Dass die Kohlensäure bei weitem die Mehrheit der Hefezellen aus gährenden Maischen an die Oberfläche bringt, ist die Grundlage der gewöhnlichen Presshefefabrikation.

Wir kommen nach dieser Abschweifung auf die durch S. Mycoderma hervorzurufende Alkoholgährung zu sprechen. Diese findet nur aus Glukose (und Lävulose) statt.

Dass auch diese Erscheinung Pasteur's Scharfblick nicht entgangen ist [1]), ist besonders deshalb bemerkenswerth, weil er mit einer für diesen Versuch minder geeigneten Flüssigkeit, nämlich Bierwürze, experimentirte. Die Ursache, warum Bierwürze für diesen Zweck nur wenig taugt, kann man eigentlich schon in unserer kleinen Tabelle nachsehen, denn daraus sieht man, das der Hauptzucker der Würze, nämlich Maltose, nicht durch den Kahmpilz assimilirt und deshalb auch nicht vergohren wird. Bei Pasteur's Versuch mit untergetauchten Kahmpilzzellen war die von ihm beobachtete Alkohol- und Kohlensäureentwicklung nur der Zersetzung, der niemals in Würze fehlenden geringen Quantität Glukose zuzuschreiben [2]). Andererseits hat die Würze die Eigenschaft, viel Kohlensäure gelöst zu halten, welche daraus dann beim Schütteln auf einmal entweicht. Da es Pasteur unbekannt war, dass Maltose nicht durch den Kahmpilz zerlegt wird, konnte er seinen Versuch nicht verbessern. Unsere neue Einsicht gestattet aber eine zweckmässigere Versuchsanordnung. Nur muss man bei der Darreichung der Glukose eine allzureichliche Luftzufuhr verhindern, denn wenn der Sauerstoff freien Zutritt hat, so verbrennt nicht nur der schon gebildete Alkohol, sondern auch dieser Zucker selbst, sehr leicht zu Wasser und Kohlensäure. Andererseits darf der Sauerstoff nicht gänzlich fehlen, denn dann findet überhaupt kein Wachsthum und keine Gährung statt. Da es mir darum zu thun war, den Alkohol nicht spurenweise, sondern bei Grammen zu erhalten, habe ich mehrere Versuche ausgeführt zur Bestimmung der besten Gefässform, um diesen verschiedenen Erfordernissen Genüge zu leisten. Ich bin dabei schliesslich bei dem ursprünglichen Gebrauch eines geräumigen Pasteur'schen Kolbens von einem Liter Inhalt, welcher zu $^3/_4$ angefüllt wurde, stehen geblieben. Die beiden Tubulaturen werden mit Baumwolle verschlossen, um das Durchsaugen der Luft und damit das Entfernen der Kohlensäureschicht, welche bei der Gährung über der Flüssigkeit entsteht, dann und wann zu ermöglichen. Als Gährflüssigkeit kann man sehr verschiedene Materiale verwenden. Jede natürliche Pepton-, Amid- oder Ammonsalze enthaltende Flüssigkeit, worin überdies Phosphate vorkommen, ist nach Glukosezufügung [3]) für die Gährung geeignet. Ausgezeichnet und wegen der Reinheit des erzeugten Alkohols vorzuziehen ist eine künstliche Lösung von folgender Zusammensetzung:

1 Liter Leitungswasser, 100 g Glukose, 2 g Biammonphosphat, 0,1 g Chlorkalium, 0,05 g Magnesiumsulfat.

Nach dem Sieden und Abkühlen wird dann eine Spur Mycoderma hineingebracht. Wurde die Flüssigkeit, welche schon schwach sauer war, noch mit Salzsäure oder Aepfelsäure etwas mehr angesäuert, etwa bis auf $^3/_4$ oder 1 cM^3 Normallauge auf

[1]) Pasteur, Études sur la bière. Paris 1876. pag. 114.

[2]) In einem Aufsatze über die Glukase, das Enzym der Maltose, werden wir den Ursprung der Glukose in Bierwürze näher betrachten.

[3]) Invertzucker aus Rohrzucker, z. B. durch Invertin bereitet, sowie Lävulose sind, wie aus den früheren Angaben erhellt, ebenfalls für den Kahmpilz gährungsfähig.

100 cM³, so konnte ich keine Verbesserung bemerken. Diese Flüssigkeit kann innerhalb vierzehn Tagen, zwischen 20° und 25° C nahezu gänzlich vergähren. Alkohol und Hefeausbeute ergaben sich aber ausserordentlich verschieden, so dass Zahlenangaben werthlos erschienen. Ich will auch nicht behaupten, dass mir die allergünstigsten Wachsthums- und Gährungsbedingungen für den Kahmpilz bekannt sind, denn darüber lässt sich ein Urtheil nur durch eine lange Reihe mühsamer quantitativer Versuche abgewinnen, deren Ausführung ich bisher nicht bezweckte.

Es ist leicht, auf die beschriebene Weise beträchtliche Quantitäten Alkohol zu gewinnen. Ich habe mehrere Hundert cM³ dargestellt und denselben identisch mit dem gewöhnlichen Aethylalkohol gefunden.

Diese Betrachtung der Hauptzüge der Ernährungsphysiologie des Kahmpilzes betreffs dessen Kohlenstoffernährungsquellen, ermöglicht Anwendung davon zu machen für den qualitativen Nachweis von Glukose. Es ist klar, dass dieser Nachweis nur dann sicher gelingen kann, wenn man den Einfluss anderer assimilirbarer Kohlehydrate genau beurtheilen oder ausschliessen kann. Es gibt aber eine Reihe von Vorgängen, wo dieses möglich ist, Vorgänge, welche durch ihre Natur besser nach physiologischen Methoden, wie durch chemische Untersuchung erforscht werden können, und wo deshalb ein biologisches Reaktiv von hohem Werthe ist: ich meine die enzymatischen Prozesse. Ich werde dieses durch eine bestimmte Anwendung des Verfahrens erläutern, nämlich durch den Nachweis der Glukase, das Enzym der Maltose, mit Hülfe des Kahmpilzes.

Notiz über die Cholerarothreaktion.

Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde, Jena, XII. Band, 1892, S. 715—718.

Da ich mich aus praktischen Rücksichten mit Versuchen über die Zeit beschäftigt habe, während welcher Cholerabakterien mit Presshefe in Kontakt sein können, bevor sie absterben[1]), habe ich Ursache gehabt, mich über die sogenannte »Cholerarothreaktion« zu orientieren. Ich habe dabei einige Erfahrungen gewonnen, welche ich hier mittheilen will:

Bekanntlich entsteht die Cholerarothreaktion, wenn Cholerakulturen mit Schwefelsäure angesäuert werden. Man nimmt an, dass der hierbei aktive Körper Indol ist und, dass das Stattfinden der Reaktion zu gleicher Zeit anzeigt, es sei Nitrit gegenwärtig. Das Nitrit soll aus den in der Nahrung niemals fehlenden Nitraten entstehen, welche durch die Cholerabakterien reduzirt werden.

Ich habe mir nun zunächst die Frage vorgelegt, welche Nährlösung am besten geeignet ist, die Reaktion zu zeigen. Ich finde, dass dieses der Fall ist mit einer Lösung von ½% Handelspepton in Leitungswasser ohne jede weitere Hinzufügung. Mein Pepton rührt von der Firma Trommsdorff in Erfurt her. Ich kultivirte zunächst bei 30° C, und wenn eine reichliche Vegetation da war, stellte ich die Kultur an einen kühlen Ort. Eine eigentliche Haut bildet sich unter diesen Umständen nicht, dagegen ein deutlicher Fäkalgeruch. Wenn solche Kulturen mit wenigen Tropfen konzentrirter Schwefelsäure versetzt werden, entsteht eine schönrote Färbung, ungefähr wie von Rothwein mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt. Wird diesen Kulturen vor der Schwefelsäurebehandlung eine Spur Kaliumnitrit hinzugefügt, so wird die Reaktion nicht deutlicher. Etwas mehr Nitrit gibt selbst Veranlassung, dass nur eine braune Färbung entsteht und nicht mehr die eigentliche Reaktion.

Durch Erhöhung des Peptongehaltes in der Nährlösung wird das Wachsthum der Cholerabakterien zwar sehr erhöht, doch nicht die Cholerarothreaktion. Gewöhnlich nimmt diese dabei ab und verschwindet bei 2 Proz. Pepton bisweilen selbst gänzlich. Was hierbei aber bemerklich ist, ist der Umstand, dass wenn Schwefelsäure allein in der an Pepton zu reichen Kultur die Reaktion nicht mehr hervorruft, diese sofort sichtbar wird, wenn man der angesäuerten Lösung eine Spur Kaliumnitrit hinzusetzt. Das Hervorrufen der Reaktion durch Kaliumnitrit ist durch verschiedene Autoren hervorgehoben, doch glaube ich, dass die Differenz zwischen verdünnten und konzentrirten Peptonnährlösungen in dieser Beziehung unbekannt war.

---

[1]) Zu diesem Zwecke wurden Cholerabouillonkulturen der flüssigen Presshefe hinzugefügt in dem Augenblick, als diese in die Filterpresse hineinging. In der Presshefe waren die Cholerabakterien überhaupt nicht wiederzufinden, in dem aus der Presse ablaufenden Hefewasser nur während 12—18 Stunden, dann waren sie todt. Hefe ist also giftig für Cholerabakterien.

Jedenfalls scheint das Verhalten der 2-proz. Peptonlösung zu beweisen, dass die Cholerareaktion wirklich, wie die Autoren annehmen, auf die Gegenwart von Nitrit in den gewöhnlichen, sich sofort mit Schwefelsäure rothfärbenden Cholerakulturen hinweist. Entsteht dieses Nitrit aus den nicht nachweisbaren Nitratspuren der Nährlösung, so kann das Nitrat offenbar unter Umständen durch das Pepton gegen Reduktion geschützt oder, was wahrscheinlicher ist, zu Ammonsalz werden.

Es interessirte mich nun, zunächst zu wissen, ob in den Cholerakulturen die Gegenwart des Nitrit sich auch durch die anderen Reagentien nachweisen lässt. Ich habe in dieser Beziehung eine Reihe Versuche mit Diphenylamin, Sulfanilinsäure und Naphtylamin und mit Jodkalium, Stärke und Salzsäure ausgeführt, jedoch stets mit negativem Resultate. Dass ich auch in meinen ursprünglichen ½-proz. Peptonlösungen in Leitungswasser mit diesen Reagentien keine salpetrige Säure und ebensowenig mit dem Diphenylaminreaktiv Salpetersäure nachweisen konnte, brauche ich wohl kaum hervorzuheben.

Ich habe mir dann weiter die Frage vorgelegt, ob die Cholerabakterien faktisch Nitrate zu Nitriten reduziren können. Zum Zwecke der Beantwortung dieser Frage habe ich der ursprünglichen ½-proz. Peptonlösung in Leitungswasser $^1/_{50}$—$^1/_{10}$ Proz. Kaliumnitrat hinzugefügt und auf die gewöhnliche Weise kultivirt. Hierbei ergab sich, dass das Wachsthum der Cholerabakterien vorzüglich blieb, und dass die Reduktion der genannten Nitratmengen vollständig stattfinden kann, so dass das erzeugte Nitrit sich nunmehr mit den gewöhnlichen Reaktiven sehr leicht nachweisen lässt. Darin war aber die Cholerarothreaktion verschwunden. d. h. Schwefelsäure gab nur eine braune Färbung; offenbar war also, selbst aus $^1/_{50}$ Proz. Nitrat, zu viel Nitrit für das Zustandekommen der Reaktion entstanden. Nach alledem zweifle ich nicht mehr daran, dass die Reaktion wirklich verursacht wird durch das aus dem nicht nachweisbaren Nitrat durch Reduktion gebildete Nitrit [1]).

Ich glaube deshalb berechtigt zu sein, zu schliessen, dass die Cholerarothreaktion kleinere Nitritmengen anzuzeigen vermag, wie die anderen genannten Nitritreaktionen. Dass das Indol der Cholerakulturen nur das gewöhnliche Indol sein kann und nicht irgend ein Substitutionsprodukt, schliesse ich noch aus den beiden folgenden Umständen:

Ausser Salkowski's Schwefelsäure-Nitritreaktion gibt es noch eine andere Indolreaktion, auf welche mein Freund Hoogewerff, Professor am Polytechnikum Delft, mich aufmerksam zu machen die Güte hatte. Fügt man zu einer sehr verdünnten Indollösung zuerst etwas Kalilauge, dann eine Spur Nitroprussidnatrium und schliesslich Essigsäure bis zur kräftig sauren Reaktion, so entsteht eine charakteristische grünblaue Färbung. Nun ist es leicht, sich bei den Choleraptonkulturen von dem Stattfinden auch von dieser Reaktion zu überzeugen, welche man wohl die »Cholerablaureaktion« würde nennen können.

Ferner hat Herr Dokters van Leeuwen, Assistent am chemischen Laboratorium des Polytechnikums, dazu durch diese Untersuchung veranlasst, wofür ich ihm meinen Dank ausspreche, synthetisch Indol bereitet und mir davon schöne Krystallblätter zur Verfügung gestellt. Es hat sich nun ergeben, dass eine wässerige

[1]) Merkwürdigerweise konnte ich Indigschwefelsaures Natrium in $^1/_2$-proz. Peptonlösungen nicht durch Cholerabakterien zu Indigweis reduziren.

konzentrirte Lösung dieses Körpers bei Gegenwart starker Schwefelsäure, mit so geringen, den Peptonnährlösungen, zugefügten Nitritmengen, dass diese durch die anderen Reaktive nicht mehr angezeigt werden können [1], eine schön rothe Färbung erzeugt. Je mehr Indol, desto tiefer roth, dagegen wirken die kleineren Nitritmengen ebenso günstig wie etwas grössere. Eine konzentrirte Indollösung dürfte, bei Gegenwart von viel organischem Stoff, deshalb wohl das beste Reaktiv auf salpetrige Säure sein, welches überhaupt bekannt ist.

Andererseits ergibt sich, dass das Skatol, d. h. das Methylindol, weder die erste noch die letzte Reaktion anzeigt. Ich glaube deshalb, dass die Autoren mit vollem Recht die Cholerarothreaktion auf gewöhnliches Indol zurückgeführt haben.

Ich will hier nun noch einen anderen Ursprung eines Indolartigen Körpers besprechen, welcher allerdings nicht durch Cholerabakterien erzeugt wird. Derselbe entsteht unter folgenden Bedingungen:

Wenn ich meine ½-proz. Peptonlösung in Leitungswasser mit einer Platindrahtöse Wasser des Delfter Stadtgrabens infizire, so entwickelt sich darin eine reiche Vegetation unter starkem Fäulnissgeruch. Angesäuert mit konzentrirter Schwefelsäure allein, habe ich darin niemals die Rothreaktion auftreten sehen. Wenn jedoch vorher oder nachher eine Spur Kaliumnitrit hinzugefügt wird, so können sich zwei Fälle ereignen: entweder, und das ist der gewöhnliche Fall, findet keine Verfärbung statt, oder es tritt eine sehr intensive Rothfärbung ein, welche in allen Intensitäten der Farben von der gewöhnlichen Cholerareaktion bis zur Tiefe der Farbe von unverdünntem Rothwein abwechseln kann. Diese Reaktion weicht insofern von der gewöhnlichen Cholerarothreaktion ab, als sie noch sichtbar bleibt, wenn schon soviel Nitrit hinzugesetzt wird, dass dieses auch mit den anderen Reaktiven nachgewiesen werden kann. Wird der Nitritgehalt dann noch weiter erhöht, so verschwindet auch hier die Reaktion völlig. Da das Nitroprussidreaktiv in diesem Falle auch nicht den blauen, sondern einen mehr grüngelblichen Farbenton erzeugt, so glaube ich, dass dabei kein gewöhnliches Indol, sondern irgend ein Substitutionsprodukt desselben wirksam sein kann.

Aus solchen sich rothfärbenden Kulturen erhielt ich vermittelst des Plattenverfahrens auf Fleischpeptongelatine drei verflüssigende Bakterien und eine nicht verflüssigende Art, welche ich für identisch halten musste mit Bacterium coli commune. Keine dieser Arten gab jedoch an und für sich, in Peptonlösung gesät, die Cholerarothreaktion [2]. Als ein Tropfen der Mischkultur von einem solchen die Reaktion aufzeigenden Kulturkölbchen in ½-proz. Peptonlösung mit $^1/_{40}$ Proz. Kaliumnitrat ausgesät wurde, fand kräftige Entwicklung, jedoch keine Nitratreduktion statt, Nitrit konnte deshalb nicht nachgewiesen werden.

Ich erlaube mir hervorzuheben, dass dieser Versuch mit Grabenwasser für die praktische Wasseruntersuchung von Interesse ist.

---

[1]) Bekanntlich beeinträchtigt Pepton die Stärke-Jodkalium-Nitritreaktion erheblich.

[2]) Nachträgliche Bemerkung. Nach längerem Aufbewahren zeigen die Reinkulturen von einer der drei verflüssigenden Arten außerordentlich intensive »Roth-« und »Blau-Reaktionen«, welche aber abweichen von den gewöhnlichen Indolreaktionen.

Bericht über meine Kulturen niederer Algen auf Nährgelatine.

Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde, Jena, XIII. Band, 1893, S. 368—373.

In der Botanischen Zeitung von 1890 habe ich über meine Kulturversuche mit niederen Algen berichtet, welche ich durch das Gelatineverfahren isolirt hatte. Es dürfte nicht überflüssig sein, den Zustand meiner, teilweise nun schon mehr als drei Jahre fortgezüchteten Zöglinge kurz zu beschreiben.

Scenedesmus acutus ist die einzige Art, welche jene sonderbare, durch die Wärme verursachte Erscheinung der Abschwächung gezeigt hat, welche die Kultur so mancher Bakterienarten erschwert oder unmöglich macht. Die Abschwächung erinnert in jeder Beziehung an die Altersschwäche in der Tierwelt und die Beseitigung derselben am Individuum ist noch nicht gelungen. Die anfangs so schönen Kulturen sind infolge des genannten Vorganges von Monat zu Monat weniger interessant geworden und ich erwarte bald ein völliges Eingehen der Vegetationskraft. Auch ist im Jahre 1890 das so starke Vermögen, die Nährgelatine zu verflüssigen, kaum mehr bemerkbar.

Die übrigen Arten haben ihr Schicksal besser überstanden. Wohl habe ich dann und wann geglaubt, ähnliche Merkmalverluste wie bei Scenedesmus zu bemerken, doch sind die Erscheinungen wieder rückgängig geworden und das alte Verhalten besteht bei denselben bis zum heutigen Augenblicke fort.

Ich erlaube mir daran zu erinnern, dass es besonders drei Arten waren, welche ich damals ausführlich beschrieb, nämlich Chlorella vulgaris, Chlorosphaera limicola und die als Cystococcus humicola bezeichneten Gonidien von Physcia parietina. Ein Wort über jede dieser Arten.

Chlorella vulgaris habe ich seither noch mehrere Male aufs neue isoliert, nämlich aus Wasserkulturen von den Chlorellen von Hydra viridis, aus Grabenschlamm und aus nitrifizierenden Ammoniaksalzlösungen. Sind letztere mit Spuren Gartenboden infizirt, so haben dieselben oft Neigung, grün zu werden durch Chlorella vulgaris, welche in Gartenerde allgemein vorkommen dürfte[1]). Eine solche grüne Lösung ist besonders geeignet, um daraus Chlorella in Reinkultur zu erhalten. Ich fertige dafür ein verdünntes Dekokt des Laubes irgend einer Papilionacee an, erstarre mit 8 Proz. Gelatine und übergiesse eine davon gefertigte Platte mit der grünen Lösung, nachdem diese gehörig mit sterilisirtem Wasser verdünnt ist. Nach einem Monate oder länger bemerkt man unter den zahlreichen Bakterienkolonieen einzelne ausserordentliche kleine, schwarzgrüne Punkte; diese sind

[1]) Bisweilen werden diese Lösungen bräunlich durch Diatomeen und durch eine kleine sarcineartige Phycophycee.

Kolonien von Chlorella vulgaris, welche, auf Malzextraktgelatine übergebracht, kräftig fortwachsen. Das Auffinden der Kolonien auf der Platte erfordert angestrengte Aufmerksamkeit seitens des Anfängers, während es nach einiger Uebung leichter ist.

Da ich, wie gesagt, die Isolierung wiederholt ausgeführt habe, kann ich sicher beurteilen, dass diese Art durch die Jahre völlig konstant fortgezüchtet werden kann. Die Lebenszähigkeit derselben ist sehr gross, alte Kulturen aus Mai 1890 können nun noch zur Anfertigung neuer Kulturen dienen. Durch zahlreiche Kulturversuche der reinen Chlorellen in Nährlösungen, welche frei von organischen Körpern und sterilisiert waren, konnte ich feststellen, dass dieselben den Stickstoff aus Ammonsalzen, Nitriten und Nitraten zu assimilieren vermögen, wenn auch viel schwieriger wie aus den Peptonen und den Amiden des Malzes. Freier Stickstoff wird dagegen unter keinem Umstand gebunden.

Die aus Hydra viridis erhaltene Kultur hat ein sehr schwaches tryptisches Vermögen, ist jedoch sicher Chlorella vulgaris. Ob ich darin wirklich das Hydrachlorophyll besitze, und ob es nicht eine verschlungene Zelle von Chlorella vulgaris gewesen ist, welche im Magen des Tieres vielleicht ihre Keimkraft noch nicht verloren hatte und dadurch in meinen Wasserkulturen, trotz der sorgfältigsten vorhergegangenen mikroskopischen Prüfung, dennoch eine Täuschung veranlasst hat, kann ich bei der völligen morphologischen Identität der Zoochlorellen mit Chlorella vulgaris noch nicht sicher entscheiden. Denn wenn es bei einem solchen Versuche nicht gelingt, Hunderte der in Betracht gezogenen Zellen auf der Nährgelatine oder in der Nährlösung zur Entwicklung zu bringen, sondern, wie im vorliegenden Falle, nur vereinzelte davon, so kann man dem Resultate noch keine völlige Beweiskraft beilegen, wenigstens so lange nicht, bis man angeben kann, weshalb die übrigen unverändert geblieben sind.

Von meiner Chlorosphaero limicola muss ich zunächst bemerken, dass neue Isolierungen davon nicht vorgenommen wurden. Uebrigens ist die alte Kultur auch bisher ebenso vegetationskräftig und interessant geblieben wie vor drei Jahren. Die vegetative Teilung sowie die Schwärmerbildung sind in jedem Präparate sofort nachweisbar, und die Konzentrationserhöhung, welche die Schwärmerbildung aufhebt, sowie das umgekehrte Verhalten sind als konstante Eigenschaften erkannt. Eine sterile Malzextraktlösung wird durch Infizierung mit einer Gelatinekultur in ein paar Wochen grün durch zahllose grosse und kleine Schwärmer und vegetative Zellen, und erzeugt schliesslich die früher beschriebenen pseudoparenchymatischen Häute. Obschon ich der Ansicht bleibe, dass es richtig ist, Chlorosphaera generisch von Chlorococcum zu trennen, so steht es andererseits für mich fest, dass diese beiden Gattungen jedenfalls zu einer Familie gehören, nämlich zu den *Protococcaceen* in der Umgrenzung, welche Wille davon gegeben hat, und dass die Familie der *Chlorosphaeraceen* als solche gestrichen werden muss.

Die Gonidien von Physcia parietina, welche ich nach dem Beispiele von Schwendener und Bornet früher Cystococcus humicola Naegeli genannt habe, werden von Wille als Chlorococcum humicola (Naegeli) Rabenhorst bezeichnet. De Bary nennt dieselben Protococcus viridis.

In Bezug auf das Vorkommen dieser Alge im Freien, ausserhalb der Flechten, wünsche ich Folgendes zu bemerken:

Sieht man hier bei Delft einen alten Ulmenstamm bei trockenem Wetter an, so ist die ganze Oberfläche mit einer grünen, stellenweise, besonders auf der Südwestseite mit Physcia parietina untermischten Algendecke bewachsen. Bei Regen bemerkt man in der Decke eine Verschiedenheit, welche darin besteht, dass der Stamm nahe am Boden bis ca. drei Fuss hoch, durch das Wasser dunkel schwarzgrün gefärbt wird, während die Oberfläche höher am Stamme saftgrün oder selbst gelblichgrün erscheint. Nur dort, wo das aus der Krone des Baumes bei Regen nach unten kommende Wasser Kanäle gefunden hat, welche bei trockenem Wetter noch lange feucht bleiben, wenn der Stamm übrigens schon abgetrocknet ist, ist die durchfeuchtete Oberfläche schwarzgrün.

Durch mikroskopische Untersuchung findet man nun, dass an denjenigen Teilen der Algendecke, welche im durchnässten Zustande gelbgrün bleiben, der Hauptsache nach nur Pleurococcus vulgaris vorkommt, während an den schwarzgrünen Stellen neben dieser Alge das fadenförmige Hormidium parietinum, untermischt mit Chlorococcum humicola vorkommt[1]). Ich bin deshalb nun überzeugt, dass auch letztere Art sehr gemein ist, und zwar dort, wo man Grund hat, auf die Gegenwart besonders vieler organischer Körper, welche als Nährlösung auftreten können, zu schliessen. Früher zweifelte ich an dieser Allgemeinheit, allein nur deshalb, weil ich nicht an den richtigen Stellen gesucht hatte. In der eigentlichen Pleurococcusschicht der Stämme habe ich bis jetzt unsere Art noch nicht sicher auffinden können.

Neue Isolierungen der Gonidien habe ich zwar vorgenommen, jedoch infolge der langen Dauer, welche ein solcher Versuch beansprucht, nicht zu Ende geführt. Es war mir dabei nämlich nicht so sehr um eine neue Kultur zu thun, sondern um den Vergleich der Wachstumsschnelligkeit meiner alten Kultur mit den nicht kultivierten Zellen. Es war mir nämlich schon im Jahre 1891 aufgefallen, dass in dieser Beziehung Unregelmässigkeiten vorkommen. Im Herbste 1892 wurde dieses sicher, und es ist nun nicht mehr daran zu zweifeln, dass meine Gonidienkulturen unter identischen Umständen schneller auf Malzextraktgelatine wachsen, wie im Jahre 1890.

Es scheint deshalb, als ob die Form sich gewissermassen adaptiert hat an das Leben auf konzentrierten organischen Nährmassen. Hiermit dürfte auch übereinstimmen, dass meine gegenwärtigen Kulturen auf Malzextraktgelatine, in Wasser untersucht, immer aus einzelnen Zellen Schwärmer hervorteten lassen, während diese Erscheinung früher nur dann beobachtet wurde, wenn das Wachstum auf weniger konzentrierten Nährmassen, wie die genannte stattgefunden hatte. Als Kulturobjekt für physiologische und mikroskopische Untersuchungen haben die Gonidien demnach, verglichen mit dem Anfangszustande, bestimmt an Interesse gewonnen, also genau umgekehrt wie bei Scenedesmus acutus. Angesichts der zeitraubenden und in bakteriologischer Hinsicht schwierigen Isolierung der Gonidien, erkläre ich mich gern bereit, den Herren Botanikern und Bakteriologen, welche sich für die Flechten-

[1]) Im strengen Winter 1890—91 war die Pleurococcusschicht der Ulmen erfroren, nicht dagegen die Hormidium-Chlorococcumschicht. Es dauerte bis im Mai und Juni, ehe Pleurococcus wieder die Oberfläche, welche wie dunkelgraues Papier aussah, gefärbt hatte. Im Winter 1892—93, wo die Temperatur nur während einer Nacht auf — 14^{0} C gesunken ist, blieb auch Pleurococcus überall lebendig.

gonidien interessieren, durch Zusendung meines Materiales die Mühe eines solchen Versuches zu ersparen. Ich fühle mich dazu besonders veranlasst, weil es durch die schönen Untersuchungen von Famintzin und Baranetzky aus den Jahren 1867 und 1868 bekannt ist [1]), wie merkwürdig das morphologische Verhalten der Gonidien ist, so dass deren Vorkommen in den botanischen Laboratorien als Demonstrationsobjekte wichtig erscheint. Vielleicht würden dadurch auch die von mir nachgewiesenen Ernährungsverhältnisse einer erneuten Prüfung anheimfallen. Die Reihenkulturen auf Malzextraktgelatine sind sehr leicht weiter zu führen, da es nur nach 3—6 Monaten nothwendig ist, überzuimpfen, wobei dann die alte Nährgelatine mit einer dicken, schwarzgrünen Gonidienschicht überdeckt ist.

In der letzten Zeit gelang es mir, die Gonidien auch in völlig anorganischen Lösungen, im Lichte, zu einem allerdings nur sehr langsamen Wachstume zu bringen. Besonders Ammonnitrat mit Kaliumbiosphat ergab sich als dafür geeignet, und zwar 0,2 Proz. des ersteren mit 0,05 Proz. des zweiten Salzes in Leitungswasser. Calciumnitrat eignet sich für die Ernährung weniger gut, wie das Ammonsalz. Die Zellen werden in den anorganischen Lösungen viel kleiner wie auf organischer Grundlage und haben bisher merkwürdigerweise durchaus keine Schwärmsporen erzeugt, sondern sich nur vegetativ, nach dem bekannten Schema der Sporangienteilung, fortgepflanzt [2]). Das Wachstum bei ausschliesslich anorganischer Nahrung ist so langsam, dass ich noch immer überzeugt bin, dass die Gonidien in Physcia mit organischen, durch den Flechtenpilz abgegebenen Körpern ernährt werden, so dass ich an dem Doppelparasitismus der Flechten, wie ich denselben im Jahre 1890 beschrieben, festhalte.

Meine kleine Algensammlung ist noch um zwei neue, früher nicht besprochene Arten vermehrt, die eine Form ist Stichococcus major Naegeli, die andere ist eine von Chlorella vulgaris verschiedene Chlorella-Art, worauf ich bei einer anderen Gelegenheit zurückzukommen hoffe. Einmal isoliert, lassen sie sich leicht auf Malzextraktgelatine in Reihenkulturen fortzüchten. Beide wurden aus dem schwarzgrünen Ueberzuge von Ulmenrinde bei Delft, durch Aufwand von viel Geduld isoliert, nämlich aus kleinen Rasen von Hormidium parietale, welche sich bei längerem Liegen und Ueberimpfen auf Ulmenrindegelatine schliesslich als bakterienfrei erwiesen hatten. Pleurococcus vulgaris, welcher in dem Aussaatmaterial reichlich vorkam, scheint sich auf Gelatine ebensowenig zu entwickeln, wie Hormidium selbst.

Stichococcus major ist sozusagen ein dickes Stäbchenbakterium mit seitlichem Chlorophor. Die Vermehrung geschieht nur durch Teilung. In Produktivität an grüner Substanz, d. h. an Vegetationskraft, übertrifft sie alle meine übrigen Algen. Mit Stichococcus eine dunkelgrüne Gelatineschicht anzufertigen, welche für Versuche über die Beeinflussung der Sauerstoffausscheidung und des Wachstums durch das Licht ausgezeichnet ist, das ist mit dieser Art eine Sache von wenigen

[1]) Mém. de l'Acad. de St. Pétersbourg. Sér. VII. T. XI. p. 1. T. XII. p. 418.

[2]) Famintzin hat bei einer anderen Chlorococcum-Art, welche er Protococcus viridis nennt, sowie bei einer von ihm als Chlorococcum infusionum bezeichneten Chlorosphaeraform eben in den verdünnten anorganischen Lösungen die ausgiebigste Schwärmerbildung beobachtet, und dasselbe fand ich bei meiner Chlorosphaera limicola. (Bulletin de l'Acad. de St. Pétersbourg 1872. T. XVII. p. 33.)

Tagen. In Malzextraktlösungen, selbst wenn diese bis 3 Proz. Kochsalz führen, findet ebenfalls ein kräftiges, wenn auch verlangsamtes Wachstum statt, wodurch es möglich wird, die Sauerstoffbildung im Lichte bei dieser Alge vermittelst der an Meereswasser adaptierten Leuchtbakterien zu untersuchen.

Wie man sieht, habe ich gegenwärtig, wenn Scenedesmus acutus mitgerechnet wird, sechs Algenarten in Reihenkultur auf Nährgelatine. In morphologischer Beziehung ist diese kleine Sammlung wichtig, weil sie die drei Hauptformen der Zellvermehrung der Algen umfasst, nämlich die einfache Teilung (in einer Richtung) bei Stichococcus, die Sporangienteilung (unter Abstreifung der Mutterzellwand) bei Chlorella, und die vegetative Teilung und Schwärmerbildung bei Chlorosphaera und Chlorococcum. Nur die einfache Teilung in der Ebene, wie bei Ulva, und in dem Raume, wie bei Pleurococcus, fehlt in dieser Uebersicht. In physiologischer Beziehung ist es wichtig, dass bei allen das Wachstum durch organische Körper begünstigt wird, obschon sie sich auch auf Kosten von anorganischen Substanzen allein ernähren und sehr langsam fortpflanzen können.

Am Schlusse dieses Berichtes erlaube ich mir noch eine Bemerkung.

Vor kurzem erschien die interessante Dissertation von Herrn Alexander Artari, Untersuchungen über Entwicklung und Systematik einiger *Protococcoideen*. Moskau 1892. Da der Autor mich darin dann und wann nennt und einige Ansichten ausspricht, welche von den meinigen abweichen und die durch mein Kulturmaterial sofort hätten aufgeklärt werden können, so scheint es mir nicht überflüssig, zu betonen, dass, seitdem ich gezeigt habe, dass gewisse niedere Algen ebenso leicht auf Gelatine fortgezüchtet werden können wie die meisten Bakterien, das Studium dieser Algen an solche Kulturen geknüpft werden muss, da dieselben leicht zwischen den Forschern ausgetauscht werden und so eine sichere Grundlage für die Beurteilung der Identität oder Verschiedenheit des Untersuchungsmateriales, sowie in Bezug auf anderweitige physiologische Beobachtungen abgeben können. Die trockenen Präparate und flüssigen Kulturen sind für den Austausch viel weniger geeignet, schon auf Grund des Bakteriengehaltes in denselben. Auch ist man dabei weniger sicher in Bezug auf die spezifische Reinheit und begegnet vielen Schwierigkeiten bei den Reproduktionsversuchen, welche damit ausgeführt werden müssen, wenn es sich um mehr wie die blosse mikroskopische Betrachtung handelt. Die Gelatinekulturen der Algen sind von diesen Uebelständen frei.

Ueber Atmungsfiguren beweglicher Bakterien.

Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde, Jena, XIV. Band, 1893, S. 827—845.

Unter Atmungsfiguren verstehe ich die Anordnung beweglicher Mikroorganismen unter Einfluss des Sauerstoffes und der übrigen Nährstoffe bei bestimmten Versuchsbedingungen. Dieselben gelangen unter zweierlei Umständen zur Beobachtung, nämlich erstens, in den auf eine besondere Weise eingerichteten flüssigen Kulturen, und zweitens, in für das Mikroskopieren bestimmten Präparaten. Die im ersteren Falle erhaltenen Atmungsfiguren wünsche ich wegen ihrer Gestalt als »Bakterienniveaus« zu bezeichnen. Da man bei der einfachsten Versuchsanordnung zur Erzeugung derselben zugleich ein ausgezeichnetes Objekt erhalten kann zum Studium der zweiten Art der Figuren, so will ich mit der Besprechung der Bakterienniveaus anfangen. Ich will es nicht unterlassen hier hervorzuheben, dass meine Niveaus sozusagen die Resultate sind von drei Kräften, nämlich von der durch das sich verändernde spezifische Gewicht der Versuchsflüssigkeit bedingten Hinaufsteigung oder Senkung, von der durch Engelmann entdeckten[1]) Sauerstoffbewegung, und von der durch Pfeffer's schöne Untersuchungen[2]) bekannt gewordenen chemotaktischen Bewegung der betreffenden Mikrobien.

1. Bakterienniveaus.

Man lege zu Boden einer Reagensröhre eine braune Bohne (Phaseolus vulgaris var. nanus), fülle die Röhre beinahe ganz an mit destilliertem Wasser und lasse dieselbe dann bei Zimmertemperatur ruhig stehen. Es ist am besten, die Bohne eigenhändig aus der Schote zu nehmen, doch gelingt der Versuch auch mit käuflichem Material. Auch mit Samen von Lathyrus Nissolia, L. Ochrus, L. Aphaca und Vicia Faba, welche ich alle selbst geerntet hatte, erhielt ich das nämliche Resultat, wie mit Phaseolus. Auf käufliche Erbsen und Getreidekörner komme ich unten noch zurück. Da es für den Versuch essentiell ist, Strömungen vorzubeugen, so stelle man die Röhre nicht zu dicht bei einem Fenster oder bei Wärmequellen auf, sondern mitten ins Zimmer.

Die trockene Bohne (*B* Fig. 1) saugt sich zunächst voll Wasser, absorbiert gierig den im Wasser gelösten Sauerstoff und lässt gewisse lösliche Körper, welche als Bakteriennahrung fungieren, herausdiffundieren. Unter diesen Stoffen finden sich nachweislich Zucker und Phosphate.

---

[1]) Botanische Zeitung. 1881. p. 441.

[2]) Tübinger Untersuchungen. Bd. I. 1882. p. 363. Bd. II. 1888. p. 582.

Während des Einquellens beleben sich die auf der Oberfläche der Bohne angetrockneten Bakterien und fangen sofort an, sich auf Kosten der genannten Nährstoffe zu vermehren. Es entsteht dabei zunächst eine schwache, aus sich bewegenden Bakterien bestehende Trübung an der Oberfläche der Bohne, welche sich davon aber bald entfernt infolge des dort eintretenden Sauerstoffmangels. Beträgt die Temperatur ca. 20° C, so bemerkt man schon nach 24 Stunden, bei niedrigerer Temperatur etwas später, die folgende eigentümliche Erscheinung: Während im oberen Ende der Röhre das Wasser vollständig klar bleibt, entsteht in der Nachbarschaft der Bohne allmählich ebenfalls ein durchaus klarer Raum, indem die dort angehäuften Bakterien sich mehr und mehr entfernen. An einer bestimmten, von der Versuchszeit abhängigen Stelle sammeln die Bakterien sich dann zu einer ausserordentlich dünnen Schicht an, welche sich von der Seite als eine weisse, scharf gezogene Linie zeigt. Diese Schicht nenne ich ein »Bakterienniveau«; bei der beschriebenen Versuchsanstellung findet sie sich nach 2mal 24 Stunden 2 bis 3 cm von der Bohne entfernt.

Merkwürdigerweise besteht die mit den genannten Samen enthaltene Bakterienschicht nur aus einer einzigen und nach meiner Erfahrung immer aus derselben Bakterienart. Offenbar hängt die grosse Schärfe der Schicht eben mit dieser Thatsache zusammen, denn um dieselbe zu erzeugen, müssen die Bakterien mit einem sehr eigentümlichen Bewegungsvermögen ausgerüstet sein. So müssen sie z. B. dem sauerstofffreien Raume rings um die Bohne entfliehen können, was die gewöhnlichen beweglichen Bakterien nicht so gut zu thun vermögen, weil sie durch Sauerstoffentziehung bewegungslos werden und als Sediment den genannten sauerstofffreien Raum trüben. Thatsächlich kann unsere Bakterie sich denn auch, sei es auch nur während kurzer Zeit, bei vollständigem Sauerstoffabschluss bewegen, wodurch sie mit den Spirillen, den Purpurbakterien und den eigentlichen Anaërobien übereinstimmt, ohne jedoch morphologisch zu einer dieser Gruppen zu gehören.

Das »Niveau« bezeichnet also diejenige Stelle, wo der von oben kommende Sauerstoff und der von der Bohne aufsteigende Diffusionsstrom der Nährstoffe aufeinanderstossen, hier und nur hier allein findet unsere Bakterie ihre geeigneten Wachstumsbedingungen, und sie hat das Vermögen, sich dahin zu begeben, infolge ihres vom Sauerstoff bis zu einem gewissen Grade unabhängigen Bewegungsvermögens. Wie weit diese Unabhängigkeit geht, werden wir später genauer feststellen.

Das Niveau kann sich während mehrerer Tage halten [1]). Infolge der wachsenden Menge von Nährstoffen, welche aus der Bohne herausdiffundieren, steigt dasselbe allmählich nach oben, bis schliesslich eine Gleichgewichtslage erreicht wird. Führt man in den Raum oberhalb des Wasserspiegels in die Reagensröhre einen Strom Wasserstoff hinein, welcher langsam durch ein Kapillarröhrchen entweichen kann, so verdunstet der Sauerstoff aus dem Wasser und das Niveau steigt in einigen Stunden bis an die Oberfläche, cessiert man den Wasserstoffstrom und lässt die Luft wieder zutreten, so sinkt das Niveau wieder nach unten bis auf die Tiefe, wo die Bakterien ihre optimalen Ernährungs- und Atmungsverhältnisse finden. Leitet man darüber Sauerstoff, so sinkt das Niveau noch tiefer nach unten. Bringt man in das Wasser oberhalb des Niveaus irgend einen Sauerstoff absorbierenden Körper, z. B. ein keimendes Samenkorn, so

[1]) Mit Reinkulturen sind die Niveaus noch viel stabiler und bleiben oft Wochen, selbst ein paar Monate sichtbar.

fängt das Niveau bald zu steigen an. Findet sich dagegen im Wasser daselbst ein grüner Algenfaden, ein Grasblatt oder irgend ein anderer grüner Pflanzenteil, so sieht man bei Belichtung das Niveau hinab-, im Dunkeln dagegen hinaufsteigen, so dass man damit sowohl die Kohlensäurezerlegung wie die Atmungsfunktion willkürlicher lebender Körper anzeigen kann.

Hat man, wie bei diesen Versuchen vorausgesetzt, eine nicht sterilisierte Bohne verwendet, so entwickeln sich gewöhnlich aus den der Bohne anhaftenden Sporen nach 5 bis 7 Tagen im sauerstofffreien Raume neben der Bohne anaërobe Bakterien, wodurch kleine Wasserstoffblasen gebildet werden, deren Aufsteigen Strömungen in der Flüssigkeit veranlasst, wodurch das Niveau auseinandergeht.

Diesem kann vorgebeugt werden, wenn anstatt mit nicht sterilisiertem Materiale mit Reinkulturen gearbeitet wird; man erhält dann Niveaus von überraschend langer Dauer. Dazu wird Nährgelatine oder Agar (*ng* Fig. 3, 4, 5) von der gewünschten Zusammensetzung in eine trockene sterilisierte Reagensröhre gegossen, und zwar in der Weise, dass nur einige Tropfen davon zu Boden liegen und dort erstarren, ohne die Seitenwand befeuchtet zu haben. Eine Spur des Infektionsmaterials wird dann mit dem Platinfaden in die Tiefe der Röhre gebracht, wird mit sterilisirtem Wasser übergossen und weiter verfahren wie oben. Bringt man solche Präparate zur schnellen Entwicklung im Brütschranke, so muss man beim Herausnehmen, zur Vermeidung starker Strömungen, sehr langsam abkühlen. Um in letzterer Beziehung freier zu sein, habe ich das Wasser mit 1 ⁰/₀₀ Agar verdickt, die Bewegung und die Niveaubildung finden darin auch sehr gut statt, obschon das Wasser dann in eine zwar weiche, allein doch wahre Gallerte verwandelt ist [1]). Dieser Kunstgriff ist aber für den vorliegenden Zweck unnötig. Auch scheinen die Niveaus in der Gallerte etwas höher zu entstehen wie im Wasser, wahrscheinlich, weil die Diffusion des gelösten Sauerstoffes abwärts im Wasser durch die Schwere beschleunigt wird, da eine Sauerstofflösung schwerer ist wie reines Wasser, welche Beschleunigung im Agar nicht stattfindet.

Ich wünsche hier den Beweis dafür zu bringen, dass das Niveau, welches oberhalb einer Bohne entsteht, sicher in seiner Stellung durch den Sauerstoff mit bestimmt wird. Ich verweise dafür auf die Fig. 2, welche eine in dieser Beziehung gemachte Versuchsanstellung demonstriert. Man sieht darin eine U-röhre abgebildet, deren linkes Bein gänzlich mit Wasser erfüllt ist, während der Wassermeniskus im rechten Beine bei *m* steht; um diesen Wasserstand fortdauernd zu erhalten, ist das linke Bein oben mit einer aufgeschliffenen Glasplatte (*gp*), welche aber nur lose aufgelegt ist, abgeschlossen [2]). Es treten nun zwei charakteristische Erscheinungen zu Tage. Es bildet sich nämlich das (Niveau (N^1) im rechten Beine viel näher bei der

---

[1]) Ich habe einmal von Luzernesamen eine Bakterienart isoliert, welche sich durch zehnmal konzentrierteren, also 1-proz. Agar, so frei fortbewegen konnte, dass ich zunächst an ein totes Präcipitat dachte und mich veranlasst sah, die Bakterie in meinen Notizen als »Diffusionsbacillus« zu bezeichnen. Diese Art steht Perlibratus sehr nahe.

[2]) Eigentlich verwende ich für den Versuch eine U-Röhre, welche in der Biegung ein nach unten gerichtetes, angeblasenes Seitenröhrchen mit Hahn trägt; dadurch kann das Wasser leichter abgelassen und die Stellung des Niveaus besser verändert werden. Doch zeichnete ich einfachheitshalber ein gewöhnliches U-Rohr.

Bohne, wie das Niveau (N^2) im linken Beine, und während N^2 lange fortfährt, hinaufzusteigen, behält N^1 unverändert den in der Figur angegebenen Stand bei. Hieraus ergiebt sich nun ganz klar, dass das Niveau höher steigt, wenn der Sauerstoffdruck sich vermindert, wie auf der linken Seite, wo das Gas nur sehr unvollständig zutritt, und ferner, dass nicht der maximale Sauerstoffdruck aufgesucht wird, welcher an der Oberfläche herrscht, sondern eine niedere Spannung dieses Gases, wie eine solche bei N^1 herrschen muss. Andere Bakterien, wie die hier zur Erscheinung kommende Art, verhalten sich anders. Diejenigen Formen, welche wir in § 5 als »Aërobientypus« anführen, suchen die Oberfläche auf, so dass deren Niveau im rechten Beine mit dem Meniskus (*m*) zusammenfällt; den hier vorliegenden Typus werden wir als »Spirillentypus« kennen lernen. Bei dem gewöhnlichen, in Fig. 1 dargestellten Niveauversuch bemerkt man von dieser Verschiedenheit nichts, und ich werde darauf bei der folgenden Besprechung nicht weiter achten. Ich glaube aber, dass eben in der in Fig. 2 angegebenen Entfernung zwischen N^1 und *m* ein Fingerzeig vorliegt zur Bestimmung des Sauerstoffbedürfnisses auch nicht beweglicher Formen. Ich habe darauf bisher nicht genug geachtet, doch hoffe ich, zu gelegener Zeit darauf zurückzukommen.

2. Bacillus perlibratus.

Saugt man mit einer Kapillarröhre ein Tröpfchen aus dem vorgehend beschriebenen, mit einer Bohne erhaltenen Niveau, verteilt dieses in sterilisiertes Wasser und giesst letzteres über eine in einer Glasdose befindliche Nährgelatineplatte, so bemerkt man bei 20° C schon nach 24 Stunden die Kolonieen, welche zunächst sehr schnell fortwachsen. Dieselben sind ein wenig durchsichtig, von weisslicher Farbe, mit einem Stiche ins Gelbliche. Sie verflüssigen nicht, auch nicht, wenn die Zusammensetzung der Nährgelatine in irgend eine Richtung verändert wird. Durch Dextrosezusatz wird das Wachstum gefördert. Obschon Maltose und Rohrzucker nicht assimilirt werden, ist Malzwürzegelatine doch ein ebenso guter Nährboden, wie Fleischwasserpepton, offenbar infolge der Gegenwart von Amiden und etwas Dextrose und Laevulose. Kulturversuche mit Niveaus, direkt von nicht sterilisierten Bohnen erhalten, lehren, wie früher gesagt, dass darin der Hauptsache nach eine Reinkultur vorkommt, so dass die Kolonieen, auf die angeführte Weise erhalten, für die grosse Mehrheit identisch sind [1]). Um dieses Resultat zu erhalten, müssen die Niveaus nicht zu alt sein, z. B. nur 3 oder 4 Tage. Werden die Niveaus älter oder nimmt man die Probe nicht vorsichtig, so kommen auch andere Bakterienarten auf den Platten zur Entwicklung, besonders eine überall verbreitete, verflüssigende, welche ich Bacillus liquefaciens vulgaris nenne. Ungeachtet des letzteren Umstandes glaube ich aber, dass die »Niveaubakterie« sich, auch bei anderen Untersuchern, so sicher als Urheber der mit unsterilisierten Bohnen erhaltenen Niveaus ergeben wird, und dadurch so leicht kenntlich und charakterisiert ist, dass ich nicht zögere, dafür einen Artnamen zu wählen, welcher ihrer Eigenschaft, eine horizontale Ebene zu bilden, Ausdruck verleiht, nämlich Bacillus perlibratus.

---

[1]) Eigentlich gehören dieselben zu zwei nahe verwandten Varietäten, wovon diejenige, welche mehr undurchsichtige, weißliche Kolonieen erzeugt, viel seltener ist und hier nicht weiter berücksichtigt wird.

Eine kurze Beschreibung dieser Bakterie möge hier folgen:

Kocht man eine Bohne bis zur vollständigen Sterilisation mit destilliertem Wasser und impft die Flüssigkeit mit Perlibratus, so entsteht eine ziemlich üppige Kultur von ausserordentlich gut und gleichmässig beweglichen Stäbchen. Zugleich bemerkt man einen starken Fäulnisgeruch, welcher jedoch ziemlich bald verschwindet; dieser ist insoweit bemerkenswert, als Perlibratus sich bei Sauerstoffzutritt nur sehr schwierig von Pepton ernährt und Eiweisskörper überhaupt nicht peptonisiert, während der Fäulnisgeruch doch sicher auf Eiweisszersetzung beruht. Speziell sei noch hervorgehoben, dass reine Gelatine durch Perlibratus unter keinem Umstande angegriffen wird, und deshalb dafür weder als Kohlenstoff- noch als Stickstoffquelle fungieren kann. Die Stäbchen besitzen eine sehr veränderliche Länge je nach dem Kulturboden, im vorliegenden Falle sind sie ziemlich kurz und messen 3—5 μ; in Gelatinekulturen fand ich Stäbchen von 20 μ und mehr. Ihre Breite ist mässig, 0,2—0,5 μ. Sporen werden nicht gebildet und die letale Temperatur liegt unterhalb 50° C. Das Wachstumsoptimum liegt bei ca. 20—25° C. Auf das sehr eigentümliche Verhalten zum Sauerstoffe komme ich in § 5 zurück, hier will ich nur hervorheben, dass die am Ende von § 1 beschriebene Eigenschaft des Niveaus (N^1 Fig. 2), sich bis auf eine konstante Entfernung von der freien Wasseroberfläche (m) zu halten, eben eine Haupteigenschaft zur sicheren Erkennung von Perlibratus ist, welcher eben, wie die Spirillen, auf niederen Sauerstoffdruck gestimmt ist. In Bezug auf das Wachstum gehört unsere Bakterie jedoch zu den Aërobien. Sie gärt nicht und erzeugt keine besonderen Gase. Auch werden, wie es scheint, durch Perlibratus durchaus keine Enzyme abgesondert.

Ich habe Perlibratus durch die auxanographische Methode auf seine hauptsächlichsten Ernährungsbedingungen untersucht, und zwar mit folgendem Ergebnisse:

Gewöhnliche Handelsgelatine wurde mehrere Tage mit destilliertem Wasser bei niederer Temperatur ausgewaschen zur Entfernung etwa löslicher organischer Körper. Die Masse saugt dabei ca. 88 Proz. Wasser ein und wird infolge der Entfernung der Salze opalisierend. Von dem so erhaltenen sehr reinen Präparate, welches nur noch wenig Eiweiss und Pepton enthält, wird eine 7-proz. Lösung in destilliertem Wasser hergestellt und dazu 0,025 Proz. Dinatriumphosphat gegeben und sterilisiert. In ein Kölbchen von ca. 90 cm³ Inhalt werden 25 cm³ dieser Gelatine gebracht und entweder mit 1-proz. Glukose, welche als sehr gute Kohlenstoffquelle, oder 0,05-proz. Ammonsulfat, welches als ausgezeichnete Stickstoffquelle erkannt wurde, versetzt. Nach dem Erkalten, aber vor dem Erstarren, wird mit einem Platinfaden eine Prise Perlibratus von einer jungen Kultur auf Fleischwasserpeptongelatine hineingebracht, durch Reiben an der Glaswand vollständig verteilt und tüchtig mit der Gelatine vermischt. Nach dem Ausgiessen in eine Glasdose entsteht dann eine Platte, welche zwar mit Millionen von Perlibratusbakterien durchdrungen, und dennoch gänzlich durchsichtig ist und auch bleibt, sofern nicht auf die Platte Nährstoffe gebracht werden, welche das an sich für Wachstum unzureichende Phosphat und Glukose oder Phosphat und Ammonsulfat zu plastischer Nahrung vervollständigen. Kalium, Chlor, Calcium, Magnesium (und auch Schwefel) brauchen hier nicht weiter berücksichtigt zu werden, da diese Elemente schon in genügender Quantität in der 7-proz. Gelatine vorkommen, um die hervorzurufenden Wachstumserscheinungen zu

ermöglichen; nur der Kaliumgehalt wird leicht erschöpft, was man jedoch bald bemerkt und durch Auflegen auf die Platte von etwas Chlorkalium oder Kaliumphosphat verbessert. Wir haben nun zwei Platten, eine Glukosephosphatplatte, welche zur Feststellung der assimilierbaren Stickstoffquellen, und eine Ammonphosphatplatte, welche zur Bestimmung der aufnehmbaren Kohlenstoffkörper geeignet ist. Zu diesem Zwecke werden die zu untersuchenden Körper entweder als gelöste Tropfen oder als trockenes Pulver auf die Platten gelegt, sie diffundieren dann in circularen Feldern durch die Gelatine, und, für soweit sie assimilierbar sind, werden ihre Diffusionsbezirke kenntlich durch Wachstum der Perlibratusbakterien und erheben sich vom durchsichtigen Gelatineboden als weisslich trübe, opake Zirkelfelder, welche schliesslich gänzlich undurchsichtig werden.

Betrachten wir zunächst die mit der Glukoseplatte erhaltenen Resultate.

Hierauf ergaben sich als reaktionsfähig alle untersuchten Stickstoffquellen, jedoch in äusserst verschiedenem Masse.

Als beste Stickstoffquelle erkannte ich Ammonsalze, sowohl mit organischen wie mit unorganischen Säuren, Chlorammon, Ammonsulfat, Ammonphosphat, Ammonoxalat, -tartrat, -acetat, -citrat geben alle sehr kräftige Auxanogramme.

Dann folgen in der Reihe die Nitrate, welche zwar etwas schwieriger wie die Ammonsalze aufgenommen werden, was sich aus dem etwas späteren Entstehen der Felder ergiebt, allein doch sehr kräftiges Wachstum aufweisen. In den Nitratfeldern, sowohl von Kalium- wie von Natrium- und Calciumnitrat, entsteht noch eine eigentümliche Trübung durch eine sich an der Oberfläche bildende dünne Haut wahrscheinlich irgend eines Calciumsalzes.

Auch Nitrite sind für Stickstoffnahrung verwendbar, jedoch nur in grosser Verdünnung. Letzteres sieht man sofort den Feldern an, denn in der Mitte derselben bleibt ein weiter Kreis ohne Wachstum, die zu hohe Konzentration bezeichnend, so dass das eigentliche Auxanogram hier Ringgestalt annimmt. Dass es sich bei diesen Versuchen sicher um einen Assimilationsvorgang handelt, lässt sich besonders schön an den Nitritfeldern zeigen. Sticht man davon nämlich dann und wann mit einem kleinen Platinspatel Stückchen und untersucht dieselben mit irgend einem der vielen empfindlichen Nitritreaktive, so ergiebt sich, dass die Nitritreaktion aufhört, sobald das Feld aufhört sich auszudehnen und aufhört durch Wachstum trüber und undurchsichtiger zu werden.

Wir kommen nun zu denjenigen Körpern, welche nun sehr unvollständig aufgenommen werden, davon untersuchte ich Pepton siccum und Ureum. Während die früher erwähnten Körper schon nach 24 Stunden oder ein paar Tagen ein überzeugendes Resultat ergaben, war ich erst nach Verlauf von ein bis zwei Wochen sicher, dass Ureum und Pepton allerdings als Stickstoffquellen fungieren, jedoch nur in untergeordnetem Masse.

Wir gehen nun über zur Betrachtung der Ammonsulfatplatte, welche uns über die aufnehmbaren Kohlenstoffquellen belehren soll.

Hier erhalten wir sehr scharfe Resultate, einerseits mit Glukose, Laevulose, Galaktose und Glycerin, welche alle, besonders die zwei ersteren Körper, assimiliert werden und starkes, durch die Stärke der Trübung genau zu schätzendes Wachstum ergeben, welches in der angegebenen Ordnung der genannten Stoffe abnimmt. Andererseits sind die Resultate mit Maltose, Dextrin, Rohrzucker und Milchzucker

vollkommen überzeugend, — alle diese Körper sind vollständig inaktiv. Mannit ergab erst nach langer Dauer eine sehr schwache Trübung.

Ich will nun noch schliesslich ein Paar Körper anführen, welche zu gleicher Zeit als Stickstoff- und Kohlenstoffquelle fungieren und deshalb auf Phosphatplatten, welche weder Ammonsalz noch Glukose enthalten, Auxanogramme erzeugen. Dazu gehört in erster Linie Asparagin, welches vielleicht überhaupt die beste Nahrung von Perlibratus ist, was in Bezug auf das Verhalten von Pepton merkwürdig ist. Ferner erkannte ich als ausgezeichnet Ammonmalat und Ammonacetat, während Ammontartrat als Kohlenstoffkörper das Wachstum nicht unterhält und, wie oben gesagt, nur Stickstoff liefern kann. Dieses Verhalten der Weinsäure ist sehr charakteristisch, denn andere verwandte Bakterien, wie B. cyanogenus, assimilieren eben Weinsäure begierig. Ich finde, beiläufig bemerkt, dass Weinsäure überhaupt für die Diagnose vieler Bakterien nützlich ist.

3. Niveaus bei anderen Mikrobien.

Wenn man den oben mit Bohnen beschriebenen Versuch mit anderen Papilionaceen anstellt, so scheint man allgemein dasselbe Resultat, nämlich ein Perlibratusniveau, zu erhalten, denn so war der Erfolg, als ich aufs Geratewohl Lathyrus Nissolia, L. Aphaca, L. Ochrus, Vicia Faba und Luzerne wählte. Diesen Samen hatte ich selbst entschotet. Als ich dagegen im Laden gekaufte Erbsen oder eben gekeimte Gerstenkörner verwendete, entstanden zwar ebenfalls sehr schöne Niveaus, und zwar noch schneller wie mit Bohnen, wenn aber die Bakterien daraus in Reinkultur gebracht wurden, so erhielt ich neben wenigen nicht verflüssigenden Kolonieen der Hauptsache nach eine schnellverflüssigende Art, welche mir längst bekannt war als sehr allgemeiner Bewohner von allerlei Pflanzenteilen im Anfange der Zersetzung, sowie von Sandboden und Gewässern, welche arm an organischer Nahrung sind[1]). Da ich nicht daran zweifle, dass Cohn, Engelmann und Pfeffer bei ihren angeblich mit »Bacterium Termo« ausgeführten Versuchen diese Art jedenfalls massenhaft in ihren Bakteriengemischen vor sich gehabt haben, so würde ich darauf den alten Namen zu verwenden vorschlagen, wenn dieser Name nicht schon vergeben wäre an eine andere, allerdings schwierig erkennbare Form[2]). Ich will darum meine Bakterie Bacillus liquefaciens vulgaris oder kurz Bacillus vulgaris nennen. Fängt sie auf den Platten zu wachsen an, so glaubt man, B. fluorescens liquefaciens vor sich zu haben, jedoch wird überhaupt kein fluorescierender Körper erzeugt. Ein schwacher Fäulnisgeruch und die Form der Stäbchen, sowie das dadurch schliesslich erzeugte Sediment erinnerten in hohem Masse an Hauser's Proteus vulgaris[3]), doch ist von der bei dieser Art beschriebenen eigentümlichen Zooglöenbildung nichts zu bemerken. Das Wachstumsoptimum liegt niedrig, jedenfalls unterhalb 25° C, wenn auch bei höheren Temperaturen noch sehr intensive Vermehrung stattfindet. Sporen wer-

---

[1]) Aus sehr magerem Haidesand erhielt ich bisweilen Reinkulturen dieser Form, ebenso aus der Rinde der Knöllchen von Ornithopus sativus und Ornithopus perpusillus.

[2]) Bacterium Termo, Vignal, aus der Mundhöhle.

[3]) Ueber Fäulnisbakterien. Leipzig 1885.

den nicht erzeugt; Gärung findet nicht statt; das Wachstum ist durchaus aerob. Sehr schön und schnell kommen die Kolonieen zur Ausbildung auf stark verdünnten Nährböden, wie z. B. auf Luzerneextraktgelatine, wobei die Farbe einen Stich ins Braune aufzeigt, obschon die Bakterie nahezu farblos ist und nur in den Sedimenten alter Kulturen sehr schwach schwefelgelb erscheint. Hoffentlich wird unsere Art durch diese kurze Beschreibung kenntlich sein, und ich kehre zu den Niveaus zurück.

Es war mir aufgefallen, dass das Niveau von B. vulgaris höher gelegen war, wie bei Perlibratus. Um darüber Sicherheit zu erlangen, habe ich mit Reinkulturen beider Arten den folgenden Versuch angestellt:

Die auf die früher angegebene Weise hineingebrachte, in der Tiefe der Eprouvette liegende Gelatine wurde zunächst durch Berührung mit einem Platinfaden mit einer Spur der betreffenden Bakterien infiziert und dann nicht mit sterilisiertem Wasser, sondern mit einer Lösung von 1 ‰ Agar-Agar überschüttet. Eine solche Lösung kann noch unterhalb 20° C flüssig sein und ist, wie angegeben, nach deren vollständigem Erkalten zwar erstarrt, jedoch so zart und weich, dass bewegliche Bakterien sich leicht dadurch einen Weg bahnen. Die Niveaus sind identisch mit den im Wasser gebildeten, nur sind dieselben stabiler, weil die Wärmeströmungen durch das Agar vorgebeugt werden.

Vergleicht man nun bei dieser Versuchsanstellung das Vulgarisniveau mit dem Perlibratusniveau, so sieht man ersteres im Verlaufe von einer Woche bei Zimertemperatur bis nahe an die Oberfläche steigen, während letzteres in der Tiefe verbleibt. Dabei wird bei Vulgaris eine eigentümliche Veränderung im Agar oberhalb des Niveaus bemerkbar, welche bei Perlibratus fehlt. Ich erkläre mir die Ursache der Verschiedenheit in der Steighöhe durch das sehr verschiedene Sauerstoffbedürfnis beider Arten, worauf wir unten noch zurückkommen, doch muss ich allerdings bekennen, dass das Verhalten mich überrascht hat, weil ich dasselbe in anderen Fällen, wo es sich erwarten liess, nicht wiederfand, und ich glaube, dass die Erklärung gesucht werden muss in einer intensiveren Ausnützung der Nährstoffe durch Perlibratus, wie durch Vulgaris.

Niveaus, welche der Hauptsache nach mit denjenigen von Perlibratus und Vulgaris übereinstimmen, erhielt ich mit Spirillum tenue, Bacillus fluorescens non liquefaciens, B. fluorescens liquefaciens, B. prodigiosus, B. radicicola Fabae, Photobacterium indicum, Ph. luminosum, Bact. Zopfii[1]). Bemerkenswert ist dabei, dass Formen, wie Fluorescens liquefaciens und Prodigiosus, welche zu den sehr wenig beweglichen Bakterien gehören, ebenso scharfe Niveaus erzeugen, wie die beweglicheren Arten. Jedoch sind ihre Niveaus dicker. So sieht man in Fig. 4 bei *N* das Niveau des wenig beweglichen Prodigiosus, bei *N* Fig. 3 dagegen das liniendünne Niveau von Zopfii, welche Bakterie auf Fleischgelatine *(ng)* sehr beweglich ist. Es ist jedoch noch auffallender, dass selbst vollständig unbewegliche Formen zwar kein gewöhnliches Niveau, allein eine sehr deutlich begrenzte Trennungsebene zwischen Nahrungs- und Sauerstoffdiffusionszone erzeugen können. Ich sah dieses bei Saccharomyces Mycoderma. Direkt oberhalb der Nahrung, welche aus Würzegelatine bestand, war eine helle Zone bis nahezu zur halben Röh-

[1]) Zu vergleichen das Ende von § 1.

renhöhe, darüber war die Flüssigkeit gleichmässig getrübt durch Zellen, welche sich tagelang schwebend erhielten und die dasselbe spezifische Gewicht wie Wasser haben mussten. Da die Mycodermazellen mit zehnfach vergrössernder Lupe einzeln zu unterscheiden sind, konnte ich beobachten, dass die Erscheinung erstens auf der grösseren Zellenzahl in der oberen Zone und zweitens auf der grösseren Durchsichtigkeit der Zellen in der Tiefe beruht. Das unter solchen Verhältnissen eine scharf sichtbare Trennungsebene sich lange, z. B. 14 Tage, erhalten kann, hat mich überrascht.

Nicht immer sind die durch bestimmte Arten erzeugten Niveaus einfach, so erzeugen Typhus und Coli commune Doppelniveaus, welche wochenlang Stand halten können. Bei einer Anfangstemperatur von 25° C, wobei die Gelatine teilweise verflüssigte, und dann bei 17—20° C einhaltender Temperatur, wobei wieder Erstarrung stattgefunden hatte, fand ich, oberhalb Fleischpetongelatine in destilliertem Wasser, bei Coli ein sehr dünnes oberes (*Na* Fig. 5) und ein nahezu cm-dickes, unteres Niveau (*Nb* Fig. 5), welche durch eine anscheinend bakterienfreie Zone von einander getrennt waren. Unter Beibehaltung ihrer Entfernung stiegen beide Niveaus allmählig aufwärts, doch war nach 14 Tagen die Oberfläche nicht erreicht. Bei Typhus war das untere Niveau schon von Anfang an dünner wie bei Coli, wenn auch dann noch beträchtlich dicker wie das obere. Später waren beide Niveaus bei Typhus gleich und papierdünn geworden; deren Entfernung war ebenfalls sehr gering, schliesslich wurde das Typhusniveau einfach, während es bei Coli doppelt blieb und noch lange sich aufwärts bewegte. Hier wie bei Mycoderma beruht die Niveaubildung mehr auf Verhältnissen des spezifischen Gewichtes wie auf chemotaktischen Bewegungen.

Bei Anaërobien ist dagegen eine sehr schöne Niveaubildung, wenn auch von anderer Natur wie die beschriebene, die Folge von dem aktiven Bestreben der Bakterien, den Sauerstoff zu fliehen. Ich habe dieses beobachtet bei Chromaticum Okenii unter den Purpurbakterien, bei meinem Butylfermente (Granulobacter butylicum), bei dem Buttersäurefermente (Gr. saccharobutyricum) und bei einer anaëroben Bakterie, welche auf Erbsen vorkommt. Da die Versuchsanstellung mit letzterer Art sehr einfach ist, will ich die Erscheinung dabei beschreiben:

Erbsen werden in trockenem Zustande in einem Reagensröhrchen in vielem Wasser aufgekocht, das Wasser wird abgegossen und durch sterilisiertes Wasser ersetzt, so dass ein gewöhnlicher Niveauversuch angestellt wird, jedoch mit ertöteten Materialien. Unter mehreren Erbsen giebt es einzelne, an deren Oberfläche dabei Sporen einer anaëroben Gärungsbakterie lebend bleiben, so dass, wenn mehrere solche Röhrchen bei Bruttemperatur gestellt werden, in einem oder dem anderen Gärungsgase und eine starke Trübung im Wasser entstehen. Wird nun ein solches Röhrchen in schiefe Stellung gebracht, so dass die Gase sofort an das Glas stossen, und so langsam an der Wand entlang aufsteigen, dass das Wasser nicht in Strömung gerät und die Bakterien sich infolge ihrer eigenen Bewegung anordnen können, dann sieht man beinahe sofort eine vollständig klare Wasserschicht im oberen Teile, wo die Luft zutreten kann, entstehen. Wird die Luft durch Wasserstoff ersetzt, so vermindert sich die Dicke der klaren Schicht. Saugt man mit einer Kapillare ein wenig Bakterienmaterial aus dem trüben Teile der Flüssigkeit, so findet man darin nur schnell bewegliche Stäbchen, welche aber, wenn sie einige Zeit in mit Sauerstoff gesättigtem

Wasser verweilt haben, bewegungslos werden, was ebenfalls zutrifft für das Butyl- und das Buttersäureferment. Auf den gewöhnlichen Platten kommen sie nicht zur Entwicklung.

Die Niveaus der Anaërobien sind dadurch charakterisiert, dass die Flüssigkeit unterhalb derselben gänzlich getrübt bleibt, durch die auch dort bewegungsfähigen Bakterien.

4. Die Atmungsfiguren am Mikroskopiertische.

In den mikroskopischen Präparaten sieht man die spezifische Anordnung der beweglichen Mikrobien entstehen, wenn dieselben in genügender Anzahl vorkommen, um sich in der Mitte des Tropfens einen sauerstofffreien Raum zu schaffen, während die Luft am Rande frei zutreten kann. Es handelt sich in diesem Falle also prinzipiell um die von Engelmann entdeckte Erscheinung der Ansammlung von Bakterien um Luftblasen, sowie um andere Sauerstoffquellen [1]). Jedoch ist meine Beobachtungsweise eine makroskopische, während bei Engelmann's Versuchen dem Mikroskope die Hauptrolle zufiel.

Dass die zu besprechenden Erscheinungen bisher nur so wenig bemerkt wurden, liegt daran, dass man beim Mikroskopieren gewöhnlich zu dünne Schichten verwendet, um deutlich sichtbare Ansammlungen zu erhalten; sobald man die Dicke der Wasserschicht zwischen Objekt- und Deckglas vergrössert, sieht man die Atmungsfiguren sofort entstehen, und zwar mit unbewaffnetem Auge. Ich verfahre wie folgt:

Anstatt das Deckglas direkt auf dem Objektträger (*O* Fig. 6) ruhen zu lassen, wird es an einem Punkte getrageu durch einen U-förmig gebogenen Platinfaden (*pf*), dessen geschlossenes Ende noch einmal, und zwar senkrecht zur ersten Krümmung gebogen ist, um leicht mit der Pinzette hantiert werden zu können. Es entsteht dadurch ein keilförmiger Raum zur Aufnahme des Tropfens. Dieser Tropfen wird von solcher Grösse gewählt, dass dadurch ungefähr die Hälfte des Raumes angefüllt *(fr)*, die andere Hälfte, als Luftraum *(lr)*, leer bleibt, wobei Meniskus *(m)* von der Länge der Mittellinie des Deckgalses entsteht. Die Quantität der im Tropfen zu verteilenden Mikrobien muss je nach Umständen gewählt werden, so dass es vorzuziehen ist, womöglich mit Kulturen auf festem Substrate zu arbeiten, da man mit den flüssigen Kulturen nicht frei ist in der Wahl jener Menge.

Ueberlegt man, wie der Sauerstoff in den Tropfen hineindringt, so ist es deutlich, dass, wenn unter dessen Beeinflussung überhaupt eine Anhäufung entsteht, diese beim Gebrauche eines runden Deckglases nahezu halbzirkelförmige Gestalt haben wird (*A* Fig. 7, 8, 9) und dass der Scheitelpunkt dieses Halbkreises zusammenfallen muss mit dem Kontaktpunkte zwischen Objektträger und Deckglas. Natürlich wird die Deutlichkeit der Ansammlung verändert mit der Schichtdicke, und gewöhnlich wird der Scheitel der Anhäufungsfigur nicht sichtbar sein, weil eben daselbst die Verhältnisse der gewöhnlichen mikroskopischen Präparate herrschen, das heisst, weil dort der Tropfen zu dünn ist. Auch ist die am Rande stattfindende Verdunstung eben an diesem Punkte relativ besonders stark, wodurch ein auswärts gerichteter sauerstofffreier Wasserstrom entsteht, worin die Bakterien sich nicht oder nur wenig bewegen. Bei den meisten

[1]) Botanische Zeitung 1881 p. 441, 1882 p. 338, 1888 p. 696.

Bakterien sind die Atmungsfiguren nicht deutlich mit dem Mikroskope zu sehen, weil gewöhnlich zu viele Bakterien bewegungslos sind, wodurch ein durchaus trübes Feld entsteht; auf dieser Trübung als Grund heben sich die Ansammlungen bei makroskopischer Betrachtung jedoch mit grosser Schärfe hervor, und zwar als scharf gezogene Linie, welche parallel dem Meniskus *(m)* und dem freien Rande verläuft *(A* Fig. 7 u. 8)[1]. Bei Arten, welche wenig beweglich sind und dadurch weniger deutliche Ansammlungen bilden, sieht man dieselben am besten mit einer ca. zehnfach vergrössernden Lupe vor einem Nordfenster bei auffallendem Lichte und schwarzem Untergrunde, oder auch, wenn das Präparat auf dem Objekttische des Mikroskops liegt, über einem weiten Diaphragma von unten beleuchtet und schräg betrachtet (nicht durch das Mikroskop selbst). Die ganze Versuchsanstellung lässt an Einfachheit gewiss nichts zu wünschen übrig.

Die Figuren bilden sich bei den verschiedenen Arten und je nach dem verschiedenen Kulturzustande derselben in sehr verschiedener Zeit, in 2—5 Minuten bis zu einer Stunde. Auch die Zahl der verwendeten Individuen und der Sauerstoffgehalt des Wassers sind dabei neben der Intensität der Beweglichkeit natürlich von Einfluss. Um bei längerer Dauer die Verdunstung vorzubeugen, müssen die Präparate in eine feuchte Glasdose gelegt werden, darin kann man die Figuren dann 24 Stunden und länger in Beobachtung halten und die durch die Erschöpfung der Nahrung bedingten Aenderungen feststellen.

5. Die Haupttypen der Atmungsfiguren.

Die nach der angeführten Methode angefertigten Atmungsfiguren lassen sich zu drei Haupttypen bringen, wozu noch zwei gemischte oder Nebentypen gebracht werden können. Die Haupttypen will ich als Aërobientypus, Spirillentypus und Anërobientypus, die Nebentypen als Vibrionen- und Monadentypus bezeichnen.

a) Aërobientypus (Fig. 7). Die hierher gehörigen Bakterien sind nur dann schnell beweglich, wenn der Sauerstoffzutritt so vollständig möglich ist, sobald Sauerstoffmangel entsteht, hört die Bewegung beinahe plötzlich auf; im Präparate suchen die Bakterien die Stelle, wo die Sauerstoffspannung am grössten ist. Diese Umstände veranlassen die Entstehung der folgenden Figur: Eine scharf angedeutete Randanhäufung *(A* Fig. 7) im Meniskus, welche aus schnell sich bewegenden Individuen besteht, ist von einem aus ruhenden Bakterien bestehenden inneren Felde durch einen sehr charakteristischen, bakterienfreien Raum (*bfr*) getrennt. Dieser Raum bezeichnet die Stelle, wo der Sauerstoffdruck beim Beginne des Versuches noch zureichend war, um die Bewegung zu ermöglichen und die bezüglichen Bakterien zu erstatten daraus, und von den im inneren Felde unbeweglich liegen bleibenden Individuen, sich zu entfernen und sich am Rande und im Meniskus anzuhäufen. Das Innenfeld ist bei vielen Arten wie durch ein grobes Präcipitat getrübt, eine Erscheinung, welche dadurch entsteht, dass die Bakterien im Augenblicke, wenn sie ihre Beweglichkeit verlieren, sich mit ihren Cilien verwirren. Als Beispiele nenne ich die mei-

---

[1]) Das hier Gesagte bezieht sich zunächst nicht auf die Anaërobien, wobei die Entstehung einer centralen Ansammlung (*A* Fig. 9) ohne weiteres deutlich ist.

sten verflüssigenden Bakterien, welche bei Wasseruntersuchungen auf den Platten gefunden werden, für soweit beweglich; darunter Bacillus liquefaciens vulgaris, oben besprochen, Bacillus luminosus der Nordsee-, und der westindische Leuchtbacillus; auch Bacillus fluorescens liquefaciens, was jedoch wegen der geringen Beweglichkeit dieser Art erst nach langer Zeit zu beobachten ist. Von nicht verflüssigenden Arten nenne ich Bacillus fluorescens non liquefaciens und Typhus. Ob Coli commune hierher gehört, konnte ich wegen der geringen Beweglichkeit noch nicht feststellen [1]).

b) Spirillentypus (Fig. 8). Bacillus perlibratus ist noch besser geeignet, diesen Typus kennen zu lernen, wie die Spirillen selbst, da derselbe viel leichter frisch und rein und in beliebiger Anzahl zu erhalten ist, und sich ebenso kräftig bewegt, wie die Spirillen. Allen gemeinsam ist eine hohe Empfindlichkeit für Spuren von Sauerstoff, Spuren so gering, dass die Formen des Aëobientypus darauf nicht mehr reagieren, sondern bewegungslos werden. Man kann deshalb sagen, dass Bakterien des Spirillentypus auf einen niedrigeren Sauerstoffdruck gestimmt sind wie diejenigen des Aërobientypus. Ihre Beweglichkeit dauert damit in Uebereinstimmung noch ziemlich lange fort, nachdem die letzten freien Sauerstoffspuren schon verbraucht sind, so dass sie imstande sind, in den Präparaten längere Zeit zu verwenden, um ihre optimalen Atmungsbedingungen aufzusuchen und nicht, wie Aërobien, sofort bei Sauerstoffabschluss erlahmt werden. Diese Eigenschaften bedingen die Form der Atmungsfigur. Diese besitzt die Gestalt einer scharf gezogenen Linie, welche sich in einiger Entfernung vom Rande und vom Meniskus ausbildet und damit nahezu parallel verläuft (*A* Fig. 8). Sie kann als »Atmungslinie« oder als »Atmungsring« angedeutet werden. Sind alle Bakterien jung und beweglich, so kann das ganze innere Feld und alles ausserhalb der Figur bakterienfrei werden, so dass eine feine lebende Linie auf durchsichtigem Grunde entsteht; anderenfalls zeigt die Figur sich zwar auf trübem Grunde, makroskopisch aber mit grösster Schärfe.

Spirillum tenue habe ich im Juni 1893 aus Grabenwasser, worin ich Eisensulfürniederschläge hatte entstehen lassen, isoliert [2]). Diese Art wächst auf allerlei Nährböden, doch verweigern dann und wann die Ueberimpfungen ohne irgend eine bekannte Ursache. Besonders auf Glycerinpeptonagar erhielt ich sehr gleichmässige bewegliche Kulturen; die Spirillen besitzen dabei 1½ bis 2 Windungen und erzeugen keine Körner, sie sind, wenn jung (das heisst 2 bis 5 Tage nach dem Ueberimpfen), besonders geeignet zur Erzeugung von Atmungsfiguren [3]). Diese sind oft dadurch bemerkenswert, dass sie sich bald nach ihrer Entstehung spalten, wodurch zwei parallele Linien entstehen, welche darauf hindeuten, dass die verschiedenen Individuen auf zwei Sauerstoffspannungen gestimmt sein können.

Die Atmungslinie von Perlibratus oder von Spirillum tenue entsteht auch besonders schön um Luftblasen, welche im Tropfen eingeschlossen liegen. So-

---

[1]) Es ist bemerkenswert, dass die fakultativ anaëroben Gärungsbakterien, wozu nach Coli commune gehört, meist wenig beweglich sind, doch giebt es Ausnahmen

[2]) Beschreibung und Abbildung bei Cohn, Beitr. z. Biologie der Pflanzen. Bd. I 1872. p. 181.

[3]) Auf Fleischwassergelatine entsteht ein Gemisch langer und kurzer Spirillen, meist mit kugeligen Körnern angefüllt. In Fleischbouillon findet kräftiges Wachstum statt und die langen Spirillen enthalten 20 und mehr Windungen.

bald in der Blase die Sauerstoffspannung auf ein bestimmtes Mass herabsinkt, rückt der Ring bis an die Oberfläche derselben.

Interessant ist es, den Ring um irgend einen grünen Pflanzenteil, welcher beleuchtet wird, sich bilden zu lassen. Blätter von Ceratophyllum und grüne Lemnawurzeln sind dafür ebenso geeignet, wie Algenfäden und Moos- und Grasblätter. Beleuchtet man ein solches Präparat mit der geeigneten Lichtfarbe, so bewegt sich die Atmungslinie rasch von der Sauerstoffquelle hinweg, um bei Verdunkelung sich letzterer wieder eng anzuschmiegen. Ich wiederhole, dass es sich hierbei um eine makroskopische Erscheinung handelt, welche mit der Lupe oder mit unbewaffnetem Auge verfolgbar ist. Mit Hilfe der Bewegung der Linie kann man die Lichtintensität in einem Zimmer auf verschiedene Entfernungen von dem Fenster annähernd bestimmen. Im Spektrum lässt sich daran die für die Kohlensäurezerlegung geeignete Lichtfarbe beurteilen. Der Versuch eignet sich auch für eine annähernde Messung, insoweit die Entfernung zwischen Sauerstoffquelle und Atmungslinie desto grösser ist, je günstiger die Lichtfarbe für die Sauerstoffentbindung.

Als Nebentypus zu dem Spirillentypus wünsche ich den Vibrionentypus hier anzuführen. Ich beobachtete denselben bei Bacillus cyanogenus, B. pyocyaneus und B. radicicola var. Fabae. Die Uebereinstimmung mit dem Spirillentypus liegt darin, dass auch hier eine scharf begrenzte Anhäufung als »Atmungslinie« in einiger Entfernung von der Sauerstoffquelle, das heisst vom Deckglasrande und Meniskus entsteht. Während aber beim Spirillentypus alles Bewegliche sich in der Linie zusammenzudrängen sucht, so ist bei unseren Vibrionen das Bestreben dazu nicht deutlich, sondern der Raum zwischen Linie und Rand bleibt immer trübe und mit schnell bewegenden Individuen erfüllt. Auch hier besteht deshalb zwar eine Stimmung auf einen niedrigeren Sauerstoffdruck, jedoch dürfte die Bevölkerung des Ringes, welche diesem niederen Drucke entspricht, fortwährend erneuert werden durch vom Meniskus und vom Rande zurückkehrende und sich später wieder dahin bewegende Individuen. Im Innern des Feldes dauert die Bewegung noch einige Zeit fort, nachdem der Sauerstoff schon fehlt, jedoch nicht so lange, wie beim Spirillentypus.

c) Anaërobientypus (Fig. 9). Alle obligat anaëroben Bakterien scheinen beweglich zu sein. Die zu diesem Typus gehörigen Formen suchen in unseren Präparaten die geringste Sauerstoffspannung, so dass sie bestrebt sind, eine centrale Ansammlung (*A* Fig. 9) zu erzeugen. Es muss bemerkt werden, dass die Beweglichkeit durch lange dauernden Kontakt mit dem Sauerstoff von normaler Spannung vollständig erlischt, so dass es ratsam ist, junge und kräftig bewegliche Präparate zu verwenden. Dieser Umstand veranlasst auch, dass beim Zuge nach dem Innern überall auf dem Wege Nachzügler bewegungslos (aber nicht tot) zurückbleiben. In der einmal gebildeten centralen Sammlung dauert die Beweglichkeit jedoch sehr lange, z. B. 24 Stunden, fort, was darauf hinweist, dass ein langsamer Sauerstoffverbrauch stattfindet; denn anders müsste die normale Sauerstoffspannung und damit das Aufhören der Bewegung eher erreicht sein [1].

[1] Durch lange fortgesetzte Studien über das anaërobe Butylferment bin ich mehr und mehr zur Ueberzeugung gekommen, dass auch die Obligatanaërobien unter natür-

Ich studierte diesen Typus an dem Butylfermente (Granulobacter-butylicum), dem Buttersäurefermente (Gr. saccharobutyricum) und der Erbsenbakterie, oben besprochen. Die beiden ersteren Fermente sind am leichtesten aus gekochten Getreidemehlansätzen zu erhalten, wie ich dieselben bei einer anderen Gelegenheit beschrieben habe, und worin gewöhnlich bewegliche Clostridien vorherrschen [1]. Doch gehören auch die von mir als »Sauerstoffformen« beschriebenen Stäbchenzustände dieser Bakterien zu dem Anaërobientypus.

Ich schliesse an den Anaërobientypus als gemischten Typus den Monadentypus an. Ich untersuchte denselben bei den schwefelführenden Purpurbakterien aus der Gattung Chromatium, doch dürften auch einige Flagellaten und Infusorien hierher gehören.

Ich habe besonders Chromatium Okenii (Länge ca. 14 μ, Dicke 6 μ) und eine kleinere, in meinen Kulturen ebenso allgemeine Art untersucht. Letztere stimmt mit Cohn's Beschreibung [2]) von Chromatium (Monas) Warmingii überein, ist aber viel kleiner (Länge ca. 10 μ, Dicke 4 μ). Bei Cohn's und bei meiner Form sind die Schwefeltropfen an den Polen, und, wenn die Teilung beginnt, in einer schmalen centralen Zone angehäuft, während bei Chr. Okenii die Schwefeltröpfchen diffus durch den Bakterienkörper verteilt sind.

Mein Material erhalte ich aus Grabenmoder. Dieser wird einfach in Stöpselflaschen ins Lichte gestellt, nachdem daran etwas Schwefelwasserstoff zugefügt ist. Dann und wann werden die Flaschen geschüttelt und ein wenig neues H^2S zugesetzt. Jedesmal sinkt der Moder dann wieder zu Boden und eine ziemlich klare Flüssigkeit steht oberhalb desselben. Nach 14 Tagen bis 2 Monaten bilden sich purpurrote Flecke am Glase und in der Tiefe des Moders. Es wird dann nicht mehr geschüttelt und etwas öfter H^2S zugegeben. Die Vermehrung geschieht dann aber schnell und es lässt sich mit einer Pipette leicht ein an Chromatien reicher Moder aufsaugen.

Besitzt man einmal gute Kulturen, so können diese ein paar Jahre lang für Versuche dienen. Zur ersten Herstellung neuer Kulturen kann man natürlich auch mit dem alten Material infizieren, was sehr zu empfehlen ist, da nicht in jeder Probe Grabenmoder Chromatien vorkommen. Nur dann habe ich dieselben unfehlbar darin vorgefunden, wenn der ganze Boden des betreffenden Grabens mit einer weissen Haut von Beggiatoa alba überwachsen war. Infiziere ich nicht, so hat Ch. Okenii zunächst Ueberhand, und wird nachher durch die zweite Art ersetzt. Infiziere ich mit letzterer, so kommt Okenii nur in Minderheit zur Entwicklung.

Mit diesen kurzen Andeutungen über die Herkunft meines Untersuchungsmaterials muss ich mich hier begnügen; für alles Weitere verweise ich auf die klassische Arbeit von Winogradsky [3]). Nur wünsche ich noch folgendes zu sagen: Ich glaube nicht, dass es ein schöneres, ein tiefinteressanteres Material zum Studium der Atmungsfiguren, der chemotaktischen und phototaktischen Bewegungen überhaupt giebt, wie die Purpurbakterien. Die Kulturschwierigkeiten sind gering und in jedem

---

lichen Lebensbedingungen freien Sauerstoff bedürfen zur bleibenden Unterhaltung ihres Lebens. Eine Spur Sauerstoff ist aber zureichend für eine lange Reihe von Generationen.

[1]) Ueber die Butylalkoholgärung und das Butylferment. (Verh. der Koninkl. Akad. van Wetensch. Amsterdam. 2. Sectie. Deel I. 1893. No. 10.)

[2]) Beitr. zur Biologie der Pflanzen. Bd. I. 1875. p. 167.

[3]) Die Schwefelbakterien. p. 50. Leipzig 1888.

physiologischen Laboratorium sollten sie immerfort zur Verfügung stehen. Die zahlreichen auf ihre Lebensbedingungen bezüglichen Fragen sind angeregt, jedoch durchaus noch nicht als gelöst zu betrachten [1]).

Die Atmungsfiguren werden nun folgenderweise erhalten: Ich bringe mehrere cm^3 von dem an Chromatien sehr reichen Moder vermittelst einer Pipette in einen kleinen viereckigen Glastrog (6 cm lang, 4 cm breit, 1 cm hoch), welcher damit vollständig angefüllt und mit einer aufgeschliffenen Glasplatte gänzlich von der Luft abgeschlossen wird. Zum Einfangen mache ich nun Gebrauch von der Eigenschaft der Chromatien, sich im Lichte anzusammeln. Dazu überdecke ich den ganzen Trog mit einem eng anschliessenden Blechdeckel, worin sich eine kleine runde oder viereckige Oeffnung befindet. Vor einem Fenster aufgestellt, so dass das Licht die Oeffnung bestrahlt, sammeln sich die Chromatien gegen die Glasplatte unter der Oeffnung, und nach einigen Stunden sieht man einen purpurroten Fleck von der Gestalt der Oeffnung entstehen. Da die Chromatien sich im Lichte festsetzen, kann man die Glasplatte von dem Wasser aufheben und abtropfen lassen, ohne dass sie wegspülen. Man kann nun mit einer Deckplatte überdecken und ein Präparat wie Fig. 6 herstellen.

Die beiden von mir untersuchten Arten haben die merkwürdige Eigenschaft, dass ihre Individuen auf verschiedene Sauerstoffspannungen gestimmt sind, je nachdem sie mit mehr oder wenig konzentrirten H_2S-Lösungen in Kontakt gewesen sind, oder wenn sie im Tropfen verschiedene Konzentrationen dieses Stoffes vorfinden. Die Verhältnisse, welche die Ansammlungen bestimmen, werden dadurch, sowie durch andere innere, nicht näher aufgeklärte Bedingungen verwickelt. Das hauptsächlich Feststehende dürfte sich wie folgt umschreiben lassen:

1. Kulturen, welche mit einem Uebermass von H_2S in Kontakt sind, sowie Kulturen, wo H_2S, sowohl in der Lösung, wie als Reserve im Chromatiumkörper fehlt, nehmen Anaërobientypus an. Durch diesen Umstand entstehen in a l l e n Präparaten nach 24 Stunden zentrale Ansammlungen (*A^2* Fig. 10).

2. In H_2S-freien Tropfen, jedoch bei Gegenwart einer Schwefelwassersoffreserve wird scheinbar Aërobientypus angenommen, wobei es jedoch, wegen fortwährend stattfindenden Individuenwechsels zwischen Rand und Inneren, nicht zu Ansammlungen kommt.

3. Bei Gegenwart einer Spur H_2S im Tropfen wird Spirillentypus angenommen.

Die Beschreibung der Figuren 10, 11 u. 12 mag das hier Gesagte noch näher beleuchten.

Fig. 10 hat Bezug auf C h r o m a t i u m O k e n i i , nämlich auf dem Schwärmerstadium desselben. Dieses Stadium entsteht bei dem angeführten Kulturverfahren vorübergehend, wenn die Ernährungsbedingungen günstig sind und der H_2S-Vorrat im Wasser z w a r e r s c h ö p f t i s t , j e d o c h n u r e b e n e r s c h ö p f t , s o d a s s e i n e a u s s e r o r d e n t l i c h r e g e L e b e n s a k t i v i t ä t v o r l i e g t , wohl infolge einer besonders starken Schwefelwasserstoffreserve im Körper der Chromatien. Bringt man eine grosse Menge dieser Schwärmer in einen Tropfen, worin sich eine Spur von H_2S vorfindet, so ist die zuerst entstehende Figur eine

[1]) Für die Bewegungsvorgänge zu vergleichen E n g e l m a n n , B a c t e r i u m p h o t o m e t r i c u m . (P f l ü g e r ' s Archiv. Bd. 30. 1883. p. 95) und E n g e l m a n n , Die Purpurbakterien. (Botan. Zeitung. 1888. p. 661.)

Atmungslinie nach Spirillentypus, welche ziemlich breit ist (A^1 Fig. 10, jedoch mehr peripherisch und breiter wie in der Zeichnung). Diese Linie zieht sich allmählich zurück vom Rande und vom Meniskus, und zu gleicher Zeit entsteht dabei eine centrale Ansammlung (A^2), welche sich schnell vergrössert auf Kosten des Bestandes des Ringes. Uebrigens lehrt die mikroskopische Betrachtung, dass auch die Individuen des Ringes rekrutiert werden aus der centralen Ansammlung, so dass der Bestand desselben fortdauernd im Wechsel begriffen ist und im Raume zwischen A^1 und A^2 immer einzelne Individuen sich in- und auswärts bewegen. Nach einigen Stunden verschwindet A^1 gänzlich und A^2 enthält den gesamten Chromatienbestand.

In diesem Falle erkläre ich A^2 durch die Gegenwart von ziemlich viel H_2S (siehe 1 oben); A^1 aus der Gegenwart von einer Spur H_2S (siehe 3 oben), den schliesslich erreichten Zustand einer centralen Ansammlung allein aus dem vollständigen Verschwinden des H_2S.

In den Fig. 11 und 12 sind Ansammlungen gezeichnet, wie sie mit meiner zweiten genannten Chromatiumart gewöhnlich entstehen, bei H_2S-Gegenwart. In Fig. 11 sieht man eine noch in Werdung begriffene Figur, welche aus dem Spirillenstadium in das Anaërobienstadium übergeht unter dem Einfluss des Verschwindens von ursprünglich vorhandenem H_2S und des Sauerstoffzutrittes. Anstatt jedoch eine centrale Ansammlung zu bilden, entstehen hier einige mehr peripherisch gelegene Bänder, jedes derselben entspricht aber einer centralen Ansammlung und die Entstehung derselben muss dadurch erklärt werden, dass die Bewegungsenergie von dieser Chromatienart eine ausserordentlich hohe ist, diejenige von Chromatium Okenii übertreffend, und dass in jeder zufällig vorhandenen Anhäufung der Sauerstoff durch diese hohe Aktivität sofort verschwindet, wodurch eine solche Anhäufung an sich das Centrum der Ansammlung von allen in deren Nähe befindlichen Bakterien wird.

In vielen Fällen vereinigen alle Chromatien sich zu einer einzelnen Figur, wie in Fig. 12 dargestellt, welche ebenfalls einer ursprünglich zufällig vorhandenen Ansammlung entspricht, welche während des Spirillenstadiums vorhanden war.

Bei allen Versuchen mit Chromatien muss auf ihre ausserordentliche Empfindlichkeit für das Licht Rücksicht genommen werden. Dieselben gehören zu den empfindlichsten Photometern, welche es überhaupt giebt, indem sie stets mit unfehlbarer Sicherheit im weissen Lichte die Stelle der höchsten Intensität aufsuchen. In den Präparaten schwimmen sie deshalb immer nach den Fensterseiten, auf der Mikroskopplatte sammeln sie sich im Focus des Spiegels. Sehr interessant ist in dieser Beziehung folgende Beobachtung: Betrachtet man ein Chromatienpräparat (besonders unsere zweite Art) mit dem Mikroskope, und schiebt nach einigen Augenblicken das Objektiv nach oben, so sieht man eine ringförmige Anordnung der Chromatien. Der innere Raum der Ringe hat genau dieselbe Grösse wie die freie Glasfläche der Frontlinse, die ringförmige Ansammlung, diejenige des nach unten gekehrten Teiles des polierten Messings des Objektivs und die ganze Erscheinung beruht auf der ungleichen Reflexion der vom Spiegel herrührenden Strahlen, welche vom Metall des Objektivs zurückgeworfen werden, nicht jedoch in gleichem Masse durch das Glas der Linse desselben.

Figurenerklärung zu Tafel III.

Fig. 1. Reagenzröhre mit einem Niveau *(N)* von Bacillus perlibratus in destilliertem Wasser oberhalb einer Bohne *(B)*; *m* Meniskus des Wassers.

Fig. 2. U-Röhre mit zwei Perlibratusniveaus *(N¹* und *N²)*, um den Sauerstoffeinfluss auf die Stellung der Niveaus zu zeigen; *gp* Glasplatte, *m* Meniskus.

Fig. 3. Niveau *(N)* von Bacterium Zopfii in destilliertem Wasser oberhalb Nährgelatine *(ng)*.

Fig. 4. Wie Fig. 3 von Bacillus prodigiosus.

Fig. 5. Doppelniveau *(Na* und *Nb)* von Bacterium coli commune in destilliertem Wasser oberhalb Nährgelatine *(ng)*.

Fig. 6. Zur Versuchsanstellung betreffs der Atmungsfiguren. *O* Objektplatte, hierauf liegt ein durch einen zweifach gebogenen Platinfaden *(pf)* getragenes Deckglas, worunter ein Luftraum *(lr)* und ein Flüssigkeitsraum *(fr)*, *m* Meniskus.

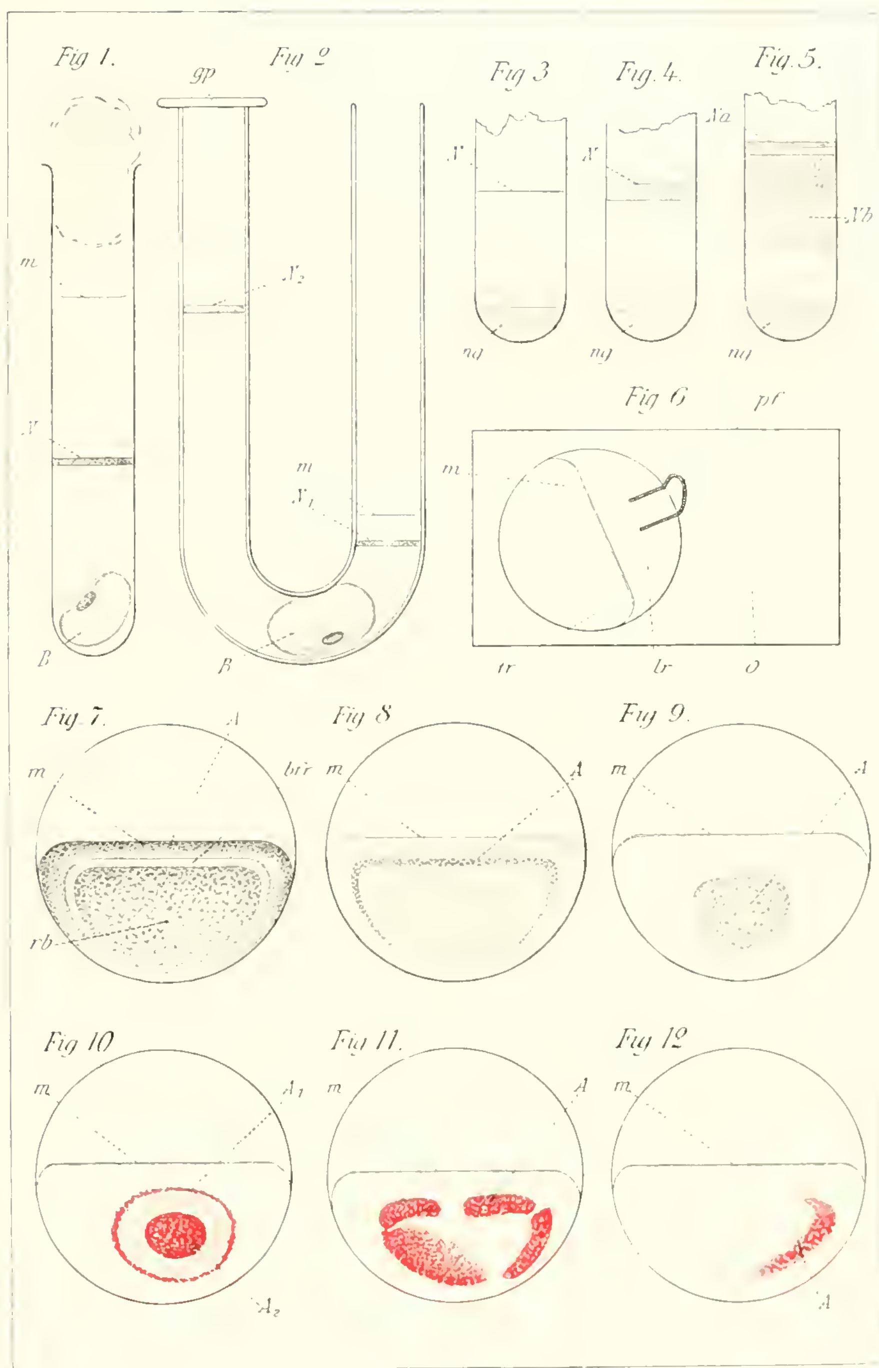
Fig. 7. Atmungsfigur des Aërobientypus. *A* Aus beweglichen Bakterien bestehende Bakterienanhäufung im Meniskus *(m)*, *bfr* bakterienfreier Raum, *rb* ruhende Bakterien.

Fig. 8. Atmungsfigur des Spirillentypus. *A* Atmungslinie, *m* Meniskus.

Fig. 9. Atmungsfigur des Anaërobientypus. *A* Bakterienansammlung, *m* Meniskus.

Fig. 10. Atmungsfigur des Schwärmerzustandes von Chromatium Okenii. *A*¹ und *A*² die nach Spirillen- und Anaërobientypus gebildeten Ansammlungen.

Fig. 11 und 12. Atmungsfiguren von der anderen Chromatiumart. Die Ansammlungen entstehen nach Spirillentypus, nehmen jedoch schliesslich Anaërobientypus an, wobei zufällige Ansammlungen in der ursprünglichen Anhäufung als Centren fungieren.


Fig 1.
Fig 2
Fig 3
Fig. 4.
Fig. 5.
Fig 6
Fig 7.
Fig 8
Fig 9.
Fig 10
Fig 11.
Fig 12

Bemerkung über die Zersetzung des Wasserstoffsuperoxyds durch lebende Organismen.

Naturwissenschaftliche Rundschau, Braunschweig, 8. Jahrgang, 1893, S. 671.

In der Naturw. Rundschau 1893, Nr. 44, S. 569, werden einige Versuche von Herrn Gottstein angeführt betreffs Zerlegung des Wasserstoffsuperoxyds durch lebende und todte Körper. Da man daraus den Eindruck bekommt, dass alle lebende Zellen diese Spaltung verursachen, wünsche ich zu bemerken, dass es auf die allerdings höchst allgemeine Regel eine Ausnahme giebt. Die Milchsäurefermente der Gährungsindustrie sind nämlich in dieser Beziehung vollständig inactiv. Man kann deshalb eine von diesen Fermenten strotzende Milchsäuregährung (z. B. versäuerten Malzbrei) mit H_2O_2 vermischen, ohne dass ein Bläschen Sauerstoff freikommt. Auch die auf Malzwürzegelatine kultivierten Kolonieen des Fermentes zerlegen H_2O_2 durchaus nicht. Dieses ist nicht Folge der sauren Reaction, denn Neutralisation mit Kreide oder mit Natriumcarbonat bringt keine Veränderung und die sehr stark sauer reagirenden Kolonien von Essigbacterien auf gleichem Nährboden neben Milchsäurefermenten kultiviert, zerlegen ziemlich energisch (obschon schwächer wie Hefe und gewöhnliche Bacterien). Da alle anderen von mir untersuchten Organismen, und davon abgeleitete Producte, so lange darin lebendes oder todtes Protoplasma vorkommt, welches nicht auf 60° C erhitzt ist, Wasserstoffsuperoxyd zerlegen, so scheint es mir interessant, eine, vielleicht die einzige Ausnahme gefunden zu haben auf eine so allgemeine Regel.

Notiz über den Nachweis von Protozoen und Spirillen in Trinkwasser.

Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde, Jena, XV. Band, 1894, S. 10—15.

Die Lebensbedingungen der meisten Protozoen und Spirillen weichen so sehr von denjenigen der Bakterien, Hefen und Schimmelarten ab, dass man dieselben bei den gewöhnlichen bakteriologischen Versuchen nur selten zur Ansicht bekommt. Durch meine Methode der »Bakterienniveaus«[1]) werden nicht nur die Spirillen-, sondern auch die Protozoenkeime in die Lage versetzt, sich zu entwickeln, denn es ist eben das Eigentümliche dieser Methode, dass in der Kulturflüssigkeit, in einem einzelnen Versuche, sozusagen alle möglichen Bedingungen in Bezug auf Konzentration der Nährstoffe und des Sauerstoffes realisiert sind, und überdies der grossen Mehrheit der uns hier zunächst interessierenden Formen, nämlich den »Bakterienfressern«, geeignete Nahrung dargeboten wird.

Ich habe meine Versuche mit Leitungswasser zu Delft angestellt. Dieses Wasser stammt aus den Dünen zu Loosduinen, wo es durch Drains gesammelt wird. Wegen der Gegenwart von Humuskörpern, welche aus der Moorschicht der Dünen herrühren, findet Klärung mit Aluminiumsulfat statt. Danach verweilt das Wasser in Absatzbassins, worin ein brauner Lack sich absetzt, und dann findet gewöhnliche Sandfiltration statt. Schliesslich strömt das Wasser durch eine Röhrenleitung von 14 Kilometer Länge und 25,4 cm Weite, um Delft zu erreichen, und auf diesem Wege verliert es, unter dem Einflusse der Mikrobien und des Eisens, die Hälfte des gelösten Sauerstoffes. Die Bakterienanzahl ist in meinem Hause sehr ungleich und wechselt mit dem Sauerstoffgehalt. Ist dieser Gehalt hoch, wie im Sommer bei grosser Hitze und viel Verbrauch, so ist die Anzahl der Keime unzählbar; im W i n t e r und F r ü h j a h r, bei einem Gehalte an Sauerstoff von ca. 3,5 cm^3 oder weniger pro Liter, finden sich in 1 cm^3 70 bis 200 Keime [2]). Diese Angaben beruhen auf Untersuchung nach dem gewöhnlichen Plattenverfahren, wobei allerdings viele interessante Formen, wie Nitrit- und Nitratfermente, Wasserbakterien aus den Gattungen C l a d o t h r i x und C r e n o t h r i x, die meisten Spirillen, anaërobe Arten, thermophile Formen u. a. nicht zur Beobachtung gelangen[3]).

---

[1]) Centralblatt für Bakteriologie. Bd. XIV. 1803. p. 827.

[2]) So war es wenigstens im Jahre 1892—93, ob immer, vermag ich noch nicht zu beurteilen.

[3]) Auch Alkoholhefen werden bei dem gewöhnlichen Gelatineverfahren nicht gefunden, und zwar infolge ihrer Seltenheit; verwendet man aber Wasserproben von 50 cm^3 oder mehr, so lässt sich darin gewöhnlich eine bestimmte Art nachweisen.

Ich hatte geglaubt, dass sich in diesem Wasser keine Infusorien und Monaden in merklicher Anzahl vorfinden würden. Darin habe ich mich jedoch geirrt; aus 25 cm³ erhalte ich immer einige Monadenarten und bisweilen auch eine Infusorie. Aus viel weniger, die untere Grenze kenne ich noch nicht, jedenfalls aus weniger wie 3 cm³, kommen ausnahmslos Monaden zur Entwicklung. Auch Spirillen von verschiedener Art fehlen niemals. Zum Auffinden dieser Organismen verfahre ich wie folgt:

Es werden, wie für einen Reinkulturniveauversuch, einige Tropfen einer geeigneten Nährgelatine oder Agar am Boden einer sterilisierten Reagenzröhre erstarrt. Anstatt aber mit sterilisiertem Wasser zu übergiessen, wird mit der zu untersuchenden Wasserprobe überschichtet. Wenn ich Fleischwassergelatine verwandte, entstand innerhalb 24 Stunden oberhalb Würzegelatine nach 36 bis 48 Stunden ein scharfes Niveau. Aus welchen Bakterien dieses Niveau besteht, interessiert hier zunächst nicht, Bacillus liquefaciens vulgaris kann darin vorkommen, B. perlibratus jedenfalls nur selten. Was hier aber wohl die Untersuchung verdient, ist die Vegetation, welche sich sehr bald in dem oberhalb des Niveaus befindlichen Wasser entwickelt. Es versteht sich, dass der Gehalt an organischen Stoffen dort sehr gering sein muss, da der von unten herkommende Diffusionsstrom derselben durch das Niveau sozusagen filtriert wird und dort das eigentlich Nahrhafte wohl grösstenteils zurücklässt. Jedoch werden die Stoffwechselprodukte der im Niveau und sich unterhalb desselben befindlichen Bakterien die Vegetation wenig anspruchsvoller Arten ermöglichen. Es treffen deshalb drei Umstände im oberen Teile der Wassersäule zusammen, welche für die Entwicklung von Protozoen (sowie von Cladothrix und Crenothrix) günstig sind, nämlich, eine geringe Konzentration organischer Stoffe, ein relativ hoher Bakteriengehalt und Sauerstoffspannungen, welche zwischen sehr weiten Grenzen abwechseln. Die Folge davon ist denn auch bald bemerkbar; aus nicht zu kleinen Leitungswasserproben entwickeln sich, zunächst im Meniskus, massenhaft kleine Monaden verschiedener Arten, welche teilweise vollständig übereinstimmen mit Oikomonas termo Ehrenberg, nach Bütschli's Beschreibung[1]). Bei meinen Kulturen bildet Oikomonas termo eine äusserst feine, bläulich schimmernde Haut auf der Wasseroberfläche. Sie lebt dort in Gesellschaft mehrerer Bakterien, wovon sie sich auch ernährt. In Bezug auf die Atmungsfigur gehört sie offenbar zu dem Aërobientypus. Die Länge dieser Monade beträgt ca. 7 μ[2]), abgesehen von der einzigen Geissel, welche 8 bis 10 μ lang ist. Sie bewegt sich sehr lebhaft, setzt sich aber oft mit dem Hinterende fest. Ihr Körper ist formveränderlich und nicht immer leicht von dem einer Amöbe zu unterscheiden. Die Ernährung findet statt durch das Verschlingen kleiner Bakterien. Die Nährmasse ist in einer Ernährungsvakuole enthalten, welche schliesslich einen scharf sichtbaren, seitlichen Ballen im mittleren Teile des Körpers erzeugt. Ueberdies sind im Körper eine kleine kontraktile Vakuole und ein Kern sichtbar. Die Vermehrung geschieht durch Längstheilung, Mundöffnung und Schlund konnte ich nicht erkennen.

Nachdem die Oberfläche des Wassers durch eine dichte Bakterien- und Monadenschicht den Zutritt des Sauerstoffes nach der Tiefe erschwert, fangen die Spirillen

---

1) Protozoa. Abt. II. p. 813. Taf. 40. Fig. 2.

2) Bütschli sagt bei Oikomonas: »Länge bis 0,015 mm«, das ist aber sicher zu lang.

sich zu vermehren an. Es scheint, dass davon stets mehrere Arten im Leitungswasser vorkommen. Ueber Fleischwasserpeptongelatine fand ich oft eine ziemlich stattliche Art, welche ich für identisch mit Spirillum Undula O. F. Müller, Ehrenberg und Cohn halte und deren Anwesenheit im Trinkwasser ich nicht vermutet hatte. Diese Art gehört, wie alle bisher bekannten Spirillen, in Bezug auf ihre Atmungsfigur zu dem »Spirillentypus«. Bei reichhaltiger Entwicklung in den Röhren entsteht infolge dieser Eigenschaft ein scharf ausgebildetes, liniendünnes Niveau ungefähr einen Centimeter tief unterhalb des freien Spiegels, diejenige Stelle bezeichnend, wo der gelöste Sauerstoff in zwar sehr geringer, doch für die Spirillen in optimaler Spannung vorhanden ist. Saugt man mit einem feinen Röhrchen etwas Material aus diesem Niveau, so bekommt man gewöhnlich ein Präparat, worin sich mikroskopisch nur die genannte Spirillenart nachweisen lässt.

Nach Spirochaeten habe ich ohne Erfolg gesucht.

Etwas anders wird das Resultat, wenn anstatt Fleischpeptongelatine einige Tropfen Würzegelatine auf dem Boden der Reagenzröhre liegen. Die daraus nach oben diffundierenden Nährstoffe sind für die Bakterienentwicklung ausserordentlich günstig, besonders für das Wachstum vieler Schleimbakterien. Natürlich finden auch die etwa vorhandenen Gärungsbakterien — und auch diese fehlen im Leitungswasser niemals — ausgezeichnete Entwicklungsbedingungen, wodurch bei günstiger Temperatur schon sobald Gasbildung stattfinden kann, dass Niveaus infolge der Strömungen kaum sichtbar werden. Unter solchen Verhältnissen ist der Sauerstoff bald über die grösste Länge der Röhre verschwunden und die Oberfläche schliesst sich ab mit einer weichen, breiartigen Bakterienschicht, welche bekanntlich der beliebte Tummelplatz für Flagellaten und Infusorien ist. Bei meinen Versuchen mit Leitungswasser sind unter diesen Bedingungen ausser Oikomonas termo, welche nie fehlte, dann und wann noch drei andere Arten dieser Gruppen aufgetreten, namlich ein kleines Infusorium, wahrscheinlich Colpoda cucullus, eine zweite Oikomonasart und eine Amöbe. Ich will ferner hervorheben, dass sich in diesem Gemisch auch Cladothrix dichotoma, eine eigentümlich gekrümmte Cladothrixart, eine Crenothrix und zwei sehr kenntliche, dicke, kurze Spirillenarten, welche noch nicht beschrieben sind, in profuser Vegetation vorfanden. Es lag nicht im Zwecke dieser Untersuchung, das Bakteriengemisch an sich zu entwirren; dass dasselbe vollständig verschieden ist von dem ursprünglich im Wasser vorkommenden, lehrt schon eine einfache mikroskopische Betrachtung.

Die mehrfach gefundene Infusorie halte ich, wie gesagt, für Colpoda cucullus[1]). Die zweite Oikomonosart sowie die Amöbe konnte ich nicht weiter determinieren. Die Monade hat aber eine Eigenschaft, wodurch sie sich sofort kennbar machte, nämlich ihre niedere Sauerstoffstimmung, wodurch sie veranlasst wird, wenn sie sich unter einem freien, nicht durch eine Bakteriendecke abgeschlossenen Wassermeniskus findet, sich nahezu 1½ cm tief unter dem Meniskus anzuhäufen. Sie gehört deshalb zum »Spirillentypus«, ist jedoch auf eine noch niedrigere Sauerstoffspannung gestimmt, wie die gewöhnlichen Spirillen. Sie besitzt eine ellipsoide Gestalt, ist ungefähr so gross wie O. termo, nämlich 8 μ lang. Sie ist scharf konturiert und stärker gekörnt wie jene Art.

---

[1]) Bütschli, Protozoen. Abt. III. p. 1707. Taf. 62. Fig. 7. 1889.

Es kann nicht mein Zweck sein, die Beschreibung der aufgefundenen Protozoen hier weiter auszuführen. Ich wünsche hier ebensowenig auf den Spirillenfund, sowie auf die Wachstumsverhältnisse von Cladothrix und Crenothrix weiter einzugehen und beschränke mich nur darauf, hinzuweisen, dass diese Organismen in der üppigsten Ausbildung in den Reagenzröhrchen auftreten können. Was mir jedoch notwendig erscheint, ist, näher zu betrachten, woher die beobachteten Protozoen herstammen. Ist es vielleicht möglich, dass sie während der Versuchsanstellung aus der Luft in meine Röhren gekommen sind? Zur Erledigung dieser Frage habe ich folgende Versuche angestellt:

Erster Versuch. Sechs grosse Bechergläser wurden zur Hälfte mit einem Gemische von gleichen Teilen Grabenwasser und destilliertem Wasser angefüllt und jedem derselben eine Spur Kaliumphosphat zugegeben. Ins erste Glas wurde dazu ½ Proz. Glukose, ins zweite $^1/_{10}$ Proz. Stärke, ins dritte ¼ Proz. Rohrzucker, ins vierte gar nichts, ins fünfte 1 Proz. Pepton siccum, ins sechste einige frische Luzernestengel und -blätter gebracht. Dann wurden alle Gläser aufgekocht. Dadurch müssen Protozoen wohl ausnahmslos abgetötet sein [1]). Ich stellte die Gläser nun auf den Tisch im Laboratorium offen auf und beobachtete dann und wann den Zustand der Haut, welche sich an der Oberfläche bildete. Ich erwartete darin, wenigstens im Luzerneglase, bald Oikomonas und Infusorien zu finden, jedoch fand ich mich darin vom 20. Sept. bis 10. Dez. 1893, das heisst während der ganzen Versuchsdauer, getäuscht: keine einzige Monade, kein einziges Infusorium konnte ich auffinden [2]). Spirillen fehlten ebenfalls. Ich brachte dann ins Luzerne-, ins Rohrzucker- und in das Glukoseglas ein wenig Leitungswasser und fand nach einigen Tagen darin zahllose Monaden, so dass die Natur der Nährflüssigkeit, wenigstens in den genannten Gläsern, eine entsprechende war. Ich muss deshalb schliessen, dass während mehr als zehn Wochen keine Protozoencysten [3]) aus der Luft gefallen waren. Natürlich bin ich völlig überzeugt, dass dieses nur Zufall war und dass in anderen Lokalitäten Protozoen würden aufgetreten sein, allein ich habe damit erwiesen, wie äusserst gering die Chance ist, während eines Versuches aus der Luft mit Protozoen zu infizieren. Ich will noch hinzufügen, dass ich meine Niveauversuche mit Bohnen (dieses Centralbl. Bd. XIV, 1893, p. 827) oft in offenen Reagenzröhrchen ausgeführt habe, welche viele Monate aufbewahrt wurden, jedoch ebenfalls ohne dass darin jemals Protozoen zu finden waren, wenn ich anfangs nur gekochtes oder destilliertes Wasser verwendet hatte.

Zweiter Versuch. Da mir der beschriebene Versuch bei aller Einfachheit doch nicht unwichtig erscheint, habe ich denselben noch auf andere Weise ausgeführt.

In zwei sterilisierte weite Bechergläser wurde zu Boden des einen eine papierdünne Schicht Fleischpeptongelatine, ins andere eine solche Schicht von Würze-

---

[1]) Zwar wird von Dallinger und Drysdale angegeben, dass Oikomonas und Cercomonas »Sporen« erzeugen, welche in Nährflüssigkeit erst bei 131° C und 114° C absterben, das gehört aber ins Gebiet der Traumbilder.

[2]) Die letzten mikroskopischen Untersuchungen hatten während des Druckes dieses Aufsatzes stattgefunden.

[3]) Ob Oikomonas sich encystiert und getrocknet lebendig bleiben kann, weiss ich nicht, doch vermute ich es.

gelatine gegossen. Nach dem Erstarren wurden die Gelatineschichten mit gekochtem, destilliertem Wasser überschichtet, welches die offen auf den Tisch gestellten Gläser zu 3/4 anfullte. Es konnten nun wieder alle möglichen Nahrungskonzentrationen entstehen und auch in Bezug auf den Sauerstoff war freie Wahl ermöglicht. Aus der Zimmerluft des Laboratoriums konnten die verschiedenartigsten Keime immerfort hineinfallen. Eine während der Monate Oktober und November wöchentlich wiederholte mikroskopische Untersuchung des Inhaltes gab dasselbe Resultat wie beim vorigen Versuche: Schimmel, Sprosshefen und Bakterien in Ueberfluss, von Infusorien und Protozoen dagegen keine Spur. Auch Spirillen fehlten vollständig und natürlich auch Crenothrix und Cladothrix.

Aus diesen Versuchen geht jedenfalls klar hervor, dass die in den Niveauröhren gefundenen Spirillen, Monaden und Infusorien nur aus dem Leitungswasser und nicht aus der Luft herkünftig gewesen sind, und dass die Dauerzustände dieser Organismen in der Atmosphäre eines Laboratoriumzimmers zweifellos äusserst selten sein müssen, wenn dieselben überhaupt darin vorhanden sind.

Ich glaube im Vorhergehenden einen Schritt vorwärts gethan zu haben auf dem Wege einer allgemeinen biologischen Analyse von Wasser und anderen Flüssigkeiten, sowie von Luft. Die Methode der Niveaus ist für eine weitere Ausdehnung geeignet. Durch eine bessere Form der Glasgefässe, wodurch sich die verschiedenen Schichten leichter werden trennen lassen, ferner durch die Ersetzung der Nährstoffe durch andere, z. B. durch pathogene Materialien, durch Ueberschichtung mit bestimmten anderen Flüssigkeiten wie Wasser, — dadurch werden gewisse Fragen betreffs der Lebensbedingungen und der Morphologie bisher nicht isolierter oder kultiverter Mikrobien sich beantworten lassen. Auch für die Luftuntersuchung ergeben sich Anhaltspunkte, welche gewisse, sich auf Protozoen beziehende Fragen, wobei ich z. B. an die Fieber- und Malariaparasiten denke, von anderer Seite wie bisher in Angriff zu nehmen gestatten. Aus diesen und anderen Gründen scheint es mir von Wert, den Beweis erbracht zu haben, dass es möglich ist, auf einfache und klare Weise die Gegenwart von Monaden und Infusorien in Wasserproben nachzuweisen.

Ueber die Natur der Fäden der Papilionaceenknöllchen.

Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde, Jena, XV. Band, 1894, S. 728—732

Vor einigen Jahren habe ich mich vielfach mit der Kultur der Papilionaceenbakterien in Nährlösungen bemüht. Es hatte sich dabei herausgestellt, dass verdünnte Extrakte von Papilionaceenblättern und Stengeln unter Zusatz von 1 bis 3 Proz. Rohrzucker sich dafür am besten eigneten und die sehr merkwürdigen morphologischen Verhältnisse der Wurzelbakterien schön zur Entwicklung brachten [1]). Als ich später mehrere solche Kulturen mit Alkohol fällte und von der sich dabei ziemlich gut ausscheidenden Bakterienmasse den Stickstoff nach Kjeldahl bestimmte, ergaben sich so ausserordentlich verschiedene Zahlen, dass es klar wurde, es müsste der Bakterienkörper in manchen Fällen, neben Eiweiss, noch einen stickstofffreien Körper in beträchtlicher Menge enthalten können. Besonders bei den Bakterien von Vicia war der Stickstoffgehalt gering, während bei Lupinus und Cytisus Kulturen mit höherem Gehalte gefunden wurden [2]). Ich will noch bemerken, dass ich dabei nur Material verwendete, welches reich war an »Bakteriensternen«, weil darin ein sehr sicheres Merkmal für die Diagnose der Papilionaceenbakterien vorliegt, was bei Kulturen, welche, wie in diesem Falle, einige Monate dauern und im Dunkeln und in der Kälte aufbewahrt werden, so dass einige Gefahr für Infektion entsteht, alle Beachtung verdient.

Natürlich lag die Vermutung nahe, dass die stickstofffreie Substanz Bakterienschleim sein müsste. Als dieser Gesichtspunkt gewonnen war, überzeugte ich mich bald, dass die Schleimbildung in den Gelatinekulturen ebenfalls ausserordentlich verschieden war. Während dieselbe in den Bakterien von Vicia und Trifolium eine gewaltige ist, fehlt sie beinahe oder ganz bei Ornithopus, Lupinus und Phaseolus und nimmt eine Mittelstellung ein bei Caragana und Robinia, obschon sie auch hier unter Umständen bedeutend werden kann. Es ist nun auffallend, dass sich aus dieser Angabe ein ziemlich genauer Parallelismus ergiebt zwischen der Ausbildung der »Schleimfäden« in den Knöllchen und der Bildung des Bakterienschleimes bei den aus diesen Knöllchen gewonnenen Bakterien. Es ist nämlich bekannt, dass die Schleimfäden nur sehr wenig entwickelt sind oder auch ganz fehlen eben in

[1]) Verslagen en Mededeelingen der Kon. Akad. v. Wetenschappen te Amsterdam. 3. Reeks. 1891. Deel 8. p. 460.

[2]) Von den Bakterien von Ornithopus sativus konnte ich bisher, trotz zahlreicher Versuche, keine guten Kulturen in Nährlösungen erhalten, wohl aber auf geeigneter Nährgelatine.

den Knöllchen von L u p i n u s, P h a s e o l u s und O r n i t h o p u s und ganz besonders entwickelt sind bei V i c i a und T r i f o l i u m und in mittlerer Ausbildung vorkommen bei R o b i n i a und C a r a g a n a. Dass die Coïncidenz nicht auf Zufall beruhen kann, ist deutlich.

Zur vollständigen Gewissheit bezüglich der Natur der Fäden bin ich jedoch erst gekommen durch das Auffinden eines besonders günstigen Untersuchungsobjektes. Dieses ist die schon im März blühende V i c i a l a t h y r o i d e s aus dem Dünensande. Es ist ein kleines, schon in der Mitte des Sommers absterbendes, annuelles Kraut.

Als ich im April 1893 und 1894 die Knöllchen dieser Pflanze untersuchte, fand ich nur solche mit kleinen Bakteroiden, welche grösstenteils »erschöpft« waren und die früher von mir beschriebenen »Bläschenbakteroiden« enthielten [1]). Zwar zeigten die Knöllchen keine vollständige, allein doch eine ziemlich geförderte Bakterienüberwucherung [2]), und es war leicht, darin viele nicht in Bakteroiden verwandelte Bakterien, wenn auch ohne Bewegung, aufzufinden. In diesen Knöllchen sind die Schleimfäden zahlreich und treten beim Präparieren oft aus den Zellen. Oft sind sie mehr oder weniger zusammengezogen und nicht selten zu isolierten Kugeln zusammengeballt, welche ganz frei in den Zellen liegen. Bei einer genauen Untersuchung der Fäden und Kugeln unter Mithilfe von Farbstoffen fand ich hier, wie das auch mit den meisten Präparaten anderer Papilionaceenknöllchen gelingt, stellenweise eingeschlossene Bakterien. In anderen Fällen sind die Fäden dagegen ganz bakterienfrei.

Da ich durch diese Erfahrungen die Ueberzeugung bekommen hatte, dass die Bakterien von V i c i a l a t h y r o i d e s in dem vorliegenden Materiale zu einer besonders stark schleimerzeugenden Form gehören müssten, interessierte es mich, dieselbe in Reinkultur zu bringen, was auch gut gelungen ist.

Auch hier ergab sich, dass die Bakterien, wie gewöhnlich aus mehr oder weniger in Erschöpfung begriffenen Knöllchen, ziemlich rasch auf geeigneter Nährgelatine wachsen. Der beste Kulturboden ist, ähnlich wie ich früher für V i c i a F a b a und P i s u m angegeben habe, ein Dekokt von den grünen Teilen von Papilionaceen mit 2 Proz. Rohrzucker und 7—8 Proz. Gelatine. Es ist empfehlenswert, die Gelatine vor dem Gebrauche mit destilliertem Wasser zu extrahieren, um die löslichen Stickstoffverbindungen, wie Eiweiss und Peptone, daraus zu entfernen, weil die Knöllchenbakterien sehr empfindlich für diese Körper sind und schon bei geringer Anhäufung derselben in ihren Nährböden nicht mehr wachsen. Es scheint mir nicht überflüssig, dies noch besonders zu betonen, denn ich glaube, dass die Schwierigkeiten, welche gewissen Autoren bei ihren Kulturversuchen begegneten, daraus hervorgegangen sind, dass die Nährböden zu stickstoffreich waren. Zwar darf der gebundene Stickstoff im Nährboden nicht ganz fehlen, weil bei vollständiger Abwesenheit davon überhaupt kein Wachstum stattfindet, doch muss dieser Gehalt auf ein sehr geringes Minimum gehalten werden. Unsicheres und unregelmässiges Wachstum sind bezeichnend für Stickstoffübermass.

[1]) Es giebt noch immer Autoren, welche diese »Bläschen« für »Sporen« halten und glauben, daß die Bakterien der Papilionaceen »Dauerorgane« erzeugen, was nicht zutrifft. Die Natur der »Bläschen« ist noch nicht aufgeklärt.

[2]) Für diesen Ausdruck siehe Bot. Zeit. 1888. p. 727.

[3]) Da die Gelatine durch die Wurzelbakterien nicht verflüssigt wird, ist der Stickstoff dieser Gelatine an sich für die Bakterien sozusagen nicht gegenwärtig.

Als ich Luzernedekokt mit 2 Proz. Rohrzucker und 7 Proz. Gelatine verwendete, wurden bei den Versuchen mit Vicia lathyroides in Impfstrichen am vierten oder am fünften Tage die kleinen durchsichtigen Bakterienkolnieen sichtbar. Für die Striche konnte ich im Anfang April alle reinen Teile des Bakteriengewebes der Knöllchen verwenden. Dieses hängt mit der teilweisen Bakterienerschöpfung zusammen, wobei überall wachstumsfähige Bakterien vorkommen [1]). Meine Hoffnung, dass ich hier eine sehr schleimige Bakterie finden sollte, wurde nicht getäuscht. Die Kolonieen waren zwar äusserlich ganz gewöhnlich, ergaben sich aber als derart zäh und schleimig, dass es schwierig war, dieselben von der Gelatine zu heben, wobei sie nur als lange Fäden zu entfernen waren. Eine so starke Schleimbildung hatte ich bei keiner anderen Papilionaceenbakterie beobachtet. Bei der Fortsetzung der Reihenkulturen ist die Schleimbildung später zwar auf die für dieVicia bakterien gewöhnliche Norm zurückgegangen, das ist aber für die vorliegende Untersuchung gleichgiltig.

Schon das erste Präparat der Kolonieen, welches ich unter das Mikroskop brachte, überzeugte mich, dass die »Schleimfäden« der Knöllchen hier wiedergefunden wurden, es war kein Zweifel möglich, dass der zähe Bakterienschleim mit jenen Fäden identisch sein müsste. Je genauer der Schleim untersucht wurde, je sicherer wurde die Ueberzeugung. Durch richtiges Schieben und Drücken des Deckglases liessen sich alle möglichen Gestalten der Fäden, welche ich in den Knöllchen gesehen hatte, künstlich aus den Schleimkolonieen meiner Bakterien herstellen. Fäden und isolierte Ballen und Kugeln, entweder völlig durchsichtig oder durch noch hier und dort eingeschlossene Bakterien punktiert oder getrübt, konnten ebenso leicht erhalten werden, wie bakterienfreie schleimige Häutchen. Hierdurch wurde der Beweis gebracht, dass die Bakterienkörper leicht aus ihrer schleimigen Hautschicht herausbefördert werden können. Das Wort »Hautschicht« ist hier sicher erlaubt, denn dass der Schleim der Schleimbakterien überhaupt nur als stark gequollene Zellwand aufzufassen ist, ist schon längst bekannt. Mit Chlorzinkjod färben sich die Schleimbildungen blau, und dieses nicht, wie ich früher glaubte, nur oberflächlich, sondern durch die ganze Dicke, natürlich nur mit Ausnahme der noch eingeschlossenen Bakterien, welche gelbbraun werden. Die Fäden der Knöllchen verhalten sich ebenso, auch hier kann man sich überzeugen, dass auch das Innere aus Cellulose besteht. Wenn es schwierig ist, die Fäden der Knöllchen über ihre ganze Länge blau zu färben, so begegnet man einer ähnlichen Schwierigkeit beim Schleime der Bakterienkolonieen, worin auch gewisse Bakterien sich der Färbung durch Chlorzinkjod hartnäckig entziehen. Auch Anilinfarbstoffe, wovon ich besonders Gentianaviolett und Methylenblau verwendete, verhalten sich gegenüber Bakterienschleim und Schleimfäden identisch.

Meine früher ausgesprochene Meinung, die Fäden beständen aus Chromatinsubstanz und Protoplasma, gründete ich auf das ziemlich starke Färbungsvermögen, welches, verglichen mit dem relativ schwachen Färbungsvermögen der Papilionaceenbakterien, auffallend ist. Damals war es mir jedoch nicht bekannt, dass Bakterienschleim im allgemeinen sich oft stark durch jene Reaktive färbt, während die protoplasmatischen Bakterienleiber mancher Schleimbakterien sich der Färbung oft

[1]) In Knöllchen ohne Bakterienerschöpfung ist man für Bakterienkultur auf sehr junge Knöllchen oder auf junge Vegetationspunkte angewiesen und selbst damit gelingen nicht alle Versuche.

mehr oder weniger entziehen, und ich glaube, dass eben auch die Einhüllung der Papilionaceenbakterien durch ihre dicke Schleimhülle ihr schwaches Färbungsvermögen wenigstens teilweise bewirkt. Denn wenigstens einzelne anscheinend hüllenlose Viciabakterien sah ich intensiv Gentianaviolett und Methylenblau aufspeichern, unter der merkwürdigen, damit so oft verbundenen starken Anschwellung des Bakterienkörpers. Doch scheint es mir, dass diese Erklärung nicht ausreicht, die geringe Affinität der Papilionaceenbakterien und der Bakteroiden in solchen Fällen, wie bei Lupinus und Ornithopus, wo die Schleimhüllen jedenfalls sehr dünn sind, zu erklären.

Für den vorliegenden Zweck brauche ich auf die ferneren Eigenschaften der Wurzelbakterien von Vicia lathyroides nicht einzugehen. Fasse ich das Vorhergehende zusammen, so ergiebt sich:

1. Die Fäden der Papilionaceenknöllchen bestehen aus Bakterienschleim.

2. Dieser Schleim, welcher die Zellwände der betreffenden Bakterien repräsentiert, hat bei der Fädenbildung die zugehörigen Bakterienkörper entweder vollständig ausgestossen oder schliesst noch manche davon ein.

Es ist bemerkenswert, dass die in den Schleimfäden noch liegenden Bakterien keine Bakteroidengestalt annehmen, vielleicht bleiben dieselben auch besonders lange keimfähig, indem die Schleimhülle eine mehr oder weniger undurchdringliche Decke bildet, welche die Bakterienkörper schützt gegen den seitens des Zellprotoplasmas geübten metamorphosierenden Einfluss, welcher zur Entstehung der Bakteroiden aus den Bakterien Veranlassung giebt. Da ich es als wichtig betrachte, dies näher festzustellen, hoffe ich, darauf zurückkommen zu können.

Ich habe früher die Schleimfäden der Papilionaceenknöllchen für Ueberbleibsel der Kerntonnen erklärt, ohne über deren eigentliche Herkunft eine Ansicht auszusprechen. Ob dieselben zum Protoplasma der Zellen gehören oder daran fremdartig sein sollten, darüber war ich ganz unsicher. Indem ich nun ihre Natur als Bakterienschleim festgestellt habe, muss ich doch noch ihre Beziehung zu den Kerntonnen aufs neue hervorheben. Es ist nämlich sicher, dass der Schleim beim Prozesse der Zellteilung passiv der Teilung mit unterliegt, so dass eine Schleimpartie, welche anfangs in einer Zelle lag, später in zwei oder mehreren, durch Teilung auseinander hervorgegangenen Zellen gefunden wird. Ob hierbei Bakterienwachstum, das heisst Vermehrung dieses Schleims stattfindet, ist zunächst gleichgiltig, obschon das wohl im allgemeinen zutreffen dürfte. Es scheint mir nun, dass die mechanische Beeinflussung des Protoplasmas seitens des sich teilenden Zellkerns sich auch über den Bakterienschleim erstrecken muss und dass diese sich ebenso gut am Aufbau der Kerntonnen mit beteiligen kann, wie das Protoplasma. Es ist jedenfalls bemerkenswert, dass die Schleimfäden so ausserordentlich oft auf die Zellkerne gerichtet sind, so dass sie die Kerne angrenzender Zellen sozusagen verbinden, wobei sie vielfach genau senkrecht von den Zellwänden geschnitten werden, und dieses scheint mir darauf hinzudeuten, dass, wenigstens in solchen Fällen, die Schleimmasse während der Zellteilung in den Kerntonnen selbst vorkam. Ein weiteres Studium des Schleimes in Bezug auf das Verhalten desselben bei der Zellteilung wäre vielleicht interessant.

Dass der Schleim in Wurzelhaaren oft solche besonders lange Fäden bildet, hängt in ähnlicher Weise mit dem Wachstume dieser Haare zusammen. Da dieses Wachstum bsonders stark in die Längsrichtung stattfindet, muss auch ein ursprünglich etwa rundlicher in der jugendlichen Haaranlage gebildeter Schleimklumpen später

sich als lang gereckter Faden vorthun. Im allgemeinen müssen auf Grund der Theorie die Fäden passiv durch das Längswachstum gedehnt werden, und die Erfahrung lehrt, dass ihre Richtung in den Knöllchen mit dieser Voraussetzung in Uebereinstimmung steht. Wird der Schleim beim Wachstume der Zellen nicht durch einen Haftpunkt zurückgehalten, so muss er sich zu kugeligen Gebilden zusammenziehen. Dieses findet z. B. statt in vielen Knöllchen von Robinia Pseudacacia und bisweilen bei Lotus corniculata, wobei dann meistens die Bakterien (welche sich bei diesen Pflanzen kaum von den Bakteroiden unterscheiden) in den Schleimballen eingeschlosen verbleiben.

Ich will diese Mitteilung nicht schliessen, ohne zu bemerken, dass Alfred Koch die wahre Natur der Schleimfäden der Knöllchen zwar nicht ausgesprochen, jedoch in klaren Worten die Möglichkeit angedeutet hat, dieselben könnten vielleicht aus Bakterienschleim bestehen [1].

---

[1]) Zur Kenntnis der Fäden in den Wurzelknöllchen der Leguminosen. (Botan. Zeitung. 1890. p. 614.)

Schizosaccharomyces octosporus, eine achtsporige Alkoholhefe.

Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde, Jena, XVI. Band, 1894, S. 49—58.

Die Auffindung einer Maltosehefe, welche grosse Ascen mit konstant 8 Sporen erzeugt und über ihre Natur als Ascomycet durchaus keinen Zweifel übrig lässt, ist botanisch interessant, weil dadurch die von de Bary und Reess ausgesprochene Ansicht über die wahrscheinliche systematische Stellung der Saccharomyceten gesichert wird. Für die Histologie der Pilzzelle verspricht die Pflanze als leicht kultivierbares Laboratoriumsobjekt und wegen der ausserordentlichen Durchsichtigkeit des Inhaltes einige neue Aufschlüsse. Auf dem Gebiete der Gärungsphysiologie ist die Stellung der neuen Hefe insoweit einzig, weil noch kein Beispiel da war von einer sich nur durch Teilung und durch Sporen vermehrenden Alkoholhefe, deren Kulturen auf Gelatine und in Würze sich schliesslich gänzlich in wasserklare achtsporige Ascen von 12 bei 20 μ verändern.

Die neue Hefe gehört zu der vor kurzem von Lindner aufgestellten Gattung Schizosaccharomyces[1]). Lindner's Art wurde aus Hirsebier isoliert, welches im Jahre 1890 durch Major Wissmann aus Ostafrika importiert war, jedoch fand die Isolierung erst im Jahre 1893 durch einen Herrn Zeidler statt, also aus einem lange aufbewahrten Muster, worin die meisten übrigen Arten abgestorben waren. Die Art erzeugt nur wenig Ascosporen und ist dann meistens viersporig. Sie ist nach Lindner's guter Figur von der meinigen wesentlich verschieden.

1. Natürliche Fundorte der Maltosehefen.

Schizosaccharomyces octosporus wurde von Korinthen von Zante isoliert, und zwar von schlechten Mustern, welche lange aufbewahrt waren und worauf die ursprünglich vorhandene Weinhefe jedenfalls grösstenteils abgestorben war. Ich habe alle Ursache, zu glauben, dass Schizosaccharomyces octosporus auf Korinthen allgemein vorkommt und nur deshalb bisher übersehen wurde, weil das Wachstum davon langsamer ist, wie bei den übrigen auf Korinthen vorkom-

[1]) Schizosaccharomyces Pombe, ein neuer Gärungserreger. (Wochenschr. f. Brauerei, Jahrg. X. 1893. p. 1298.) Das Wort »Pombe« ist, wenn ich Lindner wohl verstehe, der ostafrikanische Name für Hirsebier. Als dieser Aufsatz schon an die Redaktion eingesandt war, erhielt ich durch die Güte des Herrn Dr. C. Eykman, Direktor des Laboratoriums für Bakteriologie und Pathologie zu Batavia auf Java, unter dem Namen »Arakhefe« eine Schizosaccharomyceskultur, worauf Lindner's Beschreibung vollständig passt. Herr Eykman schreibt mir, dass er darüber bald berichten wird.

menden Hefen, so dass leicht ein Ueberwuchern in den Kulturen stattfinden muss. Ich wurde auf die Art aufmerksam, als ich bei einem Versuche neben derselben nur Bakterien, Chlamydomucor racemosus und Penicillium erhielt, wogegen sie konkurrenzfähig war.

Ehe ich weitergehe, dürfte ein Wort über das Vorkommen der aktiveren Alkoholhefen, worunter ich in erster Linie die Maltosehefen verstehe, nicht überflüssig sein.

Zunächst will ich bemerken, dass Prof. F. Ludwig auf das Vorkommen von Alkoholhefen im Schleimflusse der Bäume aufmerksam gemacht hat, wobei er als Ursache andere Pilzarten erkannte [1]. Ich wünsche in dieser Beziehung zu bemerken, dass ich als eine, wenn auch nicht die nächste, Ursache des Schleimflusses der Eiche die Weidenraupe, Cossus ligniperda, erkannte. Der Schleimfluss kommt bei vielen Bäumen vor und die kranken Stellen werden vielfach von Wespen und anderen Insekten besucht, welche dadurch die Hefen verbreiten können.

Die früher gehegte Vermutung, dass der Blumennektar und der Bienenhonig natürliche Fundorte der Alkoholhefen sind, hat sich bisher nicht bewährt, denn aus vielen (auch von mir angestellten) Versuchen geht hervor, dass Gärungshefen darin entweder gar nicht vorkommen, oder nur ganz schwache Glukosehefen, welche vielleicht nur Sporidien höherer Pilze sind. Jedoch ist diese sehr ausgedehnte Frage einer weiteren Untersuchung bedürftig.

In Bezug auf den Honigtau der Blattläuse, sowie über den physiologischen Honigtau der Holzgewächse liegen überhaupt keine Untersuchungen vor.

Dagegen sind die süssen Früchte durch die grossartigen Experimente der Gärungsindustrie in dieser Beziehung besser bekannt geworden [2]. Sie bilden unzweifelhaft natürliche Vermehrungsorte der Alkoholhefen. Zwar ist die Annahme berechtigt, dass der Boden der eigentliche und ursprüngliche Wohnort der Hefen ist, jedoch wird darin nur selten eine reichliche Vermehrung stattfinden und diese muss wohl meistens durch Kontakt mit süssen Früchten vermittelt werden. Zu Boden gefallene Früchte müssen in dieser Beziehung besonders günstige Bedingungen für die Vermehrung der Alkoholhefe abgeben. Diese letztere Überlegung hat mich veranlasst, Versuche auszuführen mit im Laden gekauften Korinthen und Rosinen ohne Kerne, welche Früchte in ihrem Heimatlande zu Boden fallen und durch Zusammenfegen geerntet werden. Ich habe mich in meiner Erwartung nicht nur nicht betrogen gefunden, sondern dieselbe wurde durch das Auffinden einer Reihe von Arten, worunter mehrere interessante, übertroffen. Besonders auffallend wurde das Verhalten durch den Kontrast mit den Sultanarosinen, von welchen ich nur relativ selten Weinhefe und Saccharomyces Mycoderma var. vini, immer dagegen Schimmelarten erhielt, und mit frischen Trauben aus Hollland, wovon neben Schimmel nur Saccharomyces apiculatus zu kultivieren war.

Von kernlosen Rosinen erhielt ich z. B. 1. Echte Weinhefe (Sacch. ellipsoideus) von 8 μ Länge. 2. Eine gute Maltosehefe von 6½ μ, wovon kurz nach der Isolierung alle Zellen in den Kolonieen auf Würzegelatine und viele während der Gärung in flüssiger Würze Ascosporen erzeugten. Ich nenne diese Art

---

[1]) Berichte der deutschen botanischen Gesellschaft. Bd. IV. 1886. p. 17.

[2]) Die verschiedenartigsten Beerensäfte geraten in spontane Gärung durch, allerdings langsam gärende, Maltosehefen.

Saccharomyces passularum. 3. Eine kaum von Bierhefe zu unterscheidende Form, wahrscheinlich zu Saccharomyces cerevisiae gehörig. Von zahlreichen schwachen Glukosehefen ohne besondere Eigenschaften soll hier nicht weiter die Rede sein.

Von Korinthen wurden als besonders interessant gewonnen: 1. Eine neue Weinhefe, welche durch ihre ausserordentliche Schwere nach der ersten Isolierung technisch bemerkenswert war [1]). Die Vergärung von Malzwürze ist rasch und vollständig. Die Grösse beträgt 7 μ. 2. Eine sporenerzeugende Essigätherhefe (Saccharomyces acetaethylicus). 3. Schizosaccharomyces octosporus und neben dieser noch eine Sechszahl weniger bemerkenswerter Maltose- und Glukosehefen. Dass auf kernlosen Rosinen und Korinthen die Mucor hefe niemals fehlt, braucht wohl nicht besonders hervorgehoben zu werden. Auch kommt bei diesen Versuchen Aspergillus niger so gut wie ausnahmslos zur Entwicklung.

In Bezug auf meine Versuchsanstellung wünsche ich noch zu bemerken, dass dieses die denkbar einfachste ist: In mit Pasteur'schem Glashelm abgeschlossenen Kölbchen mit sterilisierter Gerstenmalzwürze, von 10 Saccharometergraden, werden 5—10 Rosinen oder Korinthen geworfen und dann tagelang bei 28° C im Thermostaten aufbewahrt. Da es sich hierbei meistens um das Auskeimen scharf getrockneter Ascosporen handelt, muss man dem Versuche Zeit lassen. Durch die Extraktion des Zuckers aus den Korinthen findet eine nicht unbeträchtliche Steigerung des Saccharometergrades statt. Es können dadurch sowohl Glukose- wie Maltosehefen zu Gärungserscheinungen Veranlassung geben.

Es kam mir nötig vor, diese Abschweifung über den Fundort neuer Hefen und das zur Auffindung derselben erfolgte Kulturverfahren vorauszuschicken. Man sieht, dass es nicht reiner Zufall war, dass mir die neue Form in die Hände kam, sondern eine Überlegung über den natürlichen Vermehrungsort der Alkoholhefen war dazu Hauptveranlassung. Allerdings wurde mir insoweit durch das Glück geholfen, dass sich in einer Versuchsprobe keine andern Hefen wie die achtsporige befanden, so dass ich sofort gewissermassen eine Reinkultur bekam und nur von Bakterien und Fadenpilzen zu reinigen hatte, was selbst ohne die Gelatinemethode leicht ausführbar ist. Wenn einmal die Eigenschaften gut bekannt sind, zweifle ich nicht daran, dass das Herausfinden einzelner Kolonieen von Schizosaccharomyces aus einem Ge-

---

[1]) Die Eigenschaft des schnellen Absetzens hat sich bei Versuchen im Grossen, wobei diese Hefe als Lufthefe kultiviert wurde, noch gesteigert. Dagegen ist das grosse spezifische Gewicht in den Gelatinekulturen sehr bald zurückgegangen. Ich kann es nicht unterlassen, hier zu bemerken, dass frisch aus der Natur isolierte Hefen sich oft auf eigentümliche Weise verhalten. So z. B. auch in Bezug auf das Vermögen der Ascosporenbildung, das anfangs z. B. bei Saccharomyces passularum in 100 Proz. der Zellen stattfindet, um in alten Kulturen auf 50 à 25 Proz. zurückzulaufen. Alte Laboratoriumskulturen müssen immer mit Vorsicht beurteilt werden. So wird auf Grund der Untersuchung solcher Präparate überall wiederholt, dass Saccharomyces apiculatus keine Ascosporen erzeugt. Nichtsdestoweniger ist diese Angabe unrichtig. Wünscht man sich von der Eigenschaft der Sporenbildung zu überzeugen, so braucht man diese Hefe nur frei aus der Luft oder aus trockenem Staube von Früchten zu isolieren, man wird dann, allerdings selten, Kulturen antreffen, worin einzelne Zellen zu Ascen mit 4—6 Ascosporen angeschwollen sind. Umgekehrt ist es auch sehr leicht, von echter Weinhefe asporogene Varietäten, einfach durch Kolonieen-Auswahl, zu gewinnen.

mische anderer Hefen auf Gelatineplatten gelingen wird. Das relativ langsame Wachstum und die auffallende Ähnlichkeit der Kolonieen mit denjenigen von Saccharomyces cerevisiae werden dabei dem geübten Auge zu Hilfe kommen. Denjenigen, welche sich für Wiederholung des Versuches interessieren, rate ich, schlechte, d. h. mit viel Boden vermischte Korinthen zu verwenden, welche lange aufbewahrt und scharf getrocknet sind.

2. Morphologie von Schizosaccharomyces octosporus.

Unsere Hefe kann in drei Hauptformen angetroffen werden, welche jedoch keineswegs scharf getrennt, sondern durch allerlei Übergangsstadien verbunden sind. Die Hauptformen werden am besten erkannt in jugendlichen Kolonieen auf Würzegelatine, in Gärungen und in ausgewachsenen Gelatinekulturen.

Zunächst sei bemerkt, dass eine sauer reagierende Würzegelatine ein guter Nährboden für Octosporus ist. Auf diesem Boden wird das Wachstum noch sehr bedeutend gesteigert durch Zusatz von 3—5 Proz. Glukose oder Laevulose. Dicke Gelatineplatten in Glasdosen mit oberflächlich liegenden Kolonieen sind für das Mikroskopieren besonders geeignet.

Untersucht man die ganz jungen Kolonieen, so findet man ausschliesslich nur das in Fig. 1, Taf. II gezeichnete Bild. Darin kommen in Zweiteilung begriffene Zellen von symmetrischer Gestalt und einzelne, aus den paarigen hervorgegangene vor, welche etwas unsymmetrisch und entweder ganz frei sind oder noch am dickeren Ende seitlich zwei zu zwei durch eine feine Verbindung zusammenhängen. Die Ursache dieser sonderbaren Paarbildung besteht darin, dass die in Zweiteilung begriffenen Zellen zur Zeit, wo sie ausgewachsen sind, anstatt direkt auseinander zu fallen, um einen Punkt der Trennungswand sich wie um ein Scharnier drehen, bis die zwei Teilzellen sich parallel gestellt haben. Schliesslich wird die Trennung vollkommen, die Gestalt wird symmetrisch und eine neue, in der Mitte auftretende Zellwand giebt zur Entstehung eines neuen Zellpaares Veranlassung.

Die unsymmetrische Gestalt der sehr jungen Zellen besteht darin, dass das eine Ende derselben, und zwar das Ende, welches der Teilwand entspricht, dicker ist wie das andere. Untersucht man die Wand des dicken Endes genau, so kann man in vielen Fällen daran eine deutliche Kappenbildung (Fig. 1 oben rechts) sehen. Lindner hat diese Erscheinung bei seiner Schizosaccharomyces Pombe ebenfalls gesehen und erklärt dieselbe als die nach aussen sich vorwölbende ursprüngliche Teilwand, welche durch irgend eine mit ihrem Ursprunge zusammenhängende Ursache weicher ist und schneller wächst, wie die ältere ursprüngliche Aussenwand des dünneren Teiles der Zelle. Dass diese Erklärung zutrifft, ist nicht zu bezweifeln. Besonders die grossen Ascen (Fig. 5) eignen sich zur Aufklärung der Kappenbildung.

Während die jungen Kolonieen ein sehr gleichmässiges Bild abgeben, trifft dieses nicht mehr zu beim fortschreitenden Wachstume, denn dabei verändern sich die Zellen mehr und mehr in Ascen, so dass es schliesslich schwierig ist, überhaupt noch vegetative Zellen zu finden.

Die Ascen messen gewöhnlich 12 bei 20 μ. Die Vergrösserung der Zellen ist deshalb bei der Fruktifikation sehr beträchtlich, da die ursprünglichen Teilzellen der

Zellpaare 5 à 6 bei 8 μ messen und deshalb einen noch kleineren Inhalt haben, wie die gewöhnlichen Bierhefezellen von 7 bei 8 μ. Bei den letzteren fehlt die Anschwellung bei der Ascenbildung so gut wie gänzlich. Die ansehnliche Grösse der Ascen von Schizosaccharomyces octosporus ist ein guter Unterschied von Schizos. Pombe, bei welchem nach Lindner's Beschreibung vegetative Zellen und Ascen ebenfalls gleich gross sind.

Wie gesagt, wird die Kappenbildung bei den Ascen oft mit überraschender Deutlichkeit wahrgenommen (Fig. 4 u. 5). Oft, obschon nicht immer, kommt dabei an beiden Polen der Zelle eine Kappe vor. Ich führe letzteres darauf zurück, dass die Ascen nicht in den allerjüngsten Entwicklungsstadien der Kulturen, welche nur vorwiegend aus Dyaden und deren Teilzellen (Fig. 1) bestehen, sondern sich in den späteren Stadien derselben bilden, zur Zeit, wo darin viele dreizellige und selbst vierzellige »Fäden« vorkommen. Wenn die Teilzellen solcher Komplexe frei und zu Ascen werden, müssen die mittleren Zellen davon zwei Kappen erzeugen, da sie an den beiden Polen durch Querwände begrenzt waren. Die sich an den Endzellen entwickelnden Ascen werden dagegen nur eine Kappe besitzen. Bei sehr starker Vergrösserung ergiebt sich, dass die scharfe Linie, durch welche die Kappe sich vom Zellkörper abhebt, die Grenze andeutet zwischen dem dickeren Teile der ursprünglichen Längswand und dem dünner gebliebenen der ursprünglichen Querwand (Fig. 5).

Die zweite Hauptform der Octosporuszellen wird in gärenden Würzen angetroffen. Da die Lüftung auf die Anschwellung der Zellen und auf die Ascosporenbildung von durchgreifendem Einfluss ist, liess sich erwarten, dass auch in den gärenden Flüssigkeiten ein grosser Reichtum von Zellformen vorkommen könnte, wenn Luft frei hineindringen kann oder eingeblasen wird. Gleichmässig dagegen wird das Bild der Zellen dann, wenn der Luftzutritt nur ein beschränkter ist. In Fig. 2 sieht man die Darstellung einer als »Unterhefe« fungierenden Kultur in einer gewöhnlichen Malzwürze, welche mit Milchsäure schwach angesäuert und mit 3 Proz. Glukose versetzt war, um die Gärthätigkeit zu erhöhen. Da in diesem Falle die Luft nur sehr langsam zu den Zellen vordringen kann, weil oberhalb der gärenden Flüssigkeit eine Kohlensäureschicht liegt, kann eine solche Gärung als eine anaërobe Kultur unseres Fermentes betrachtet werden.

In Fig. 3 sieht man die Darstellung einer ähnlichen Gärung, worin jedoch die Glukose durch Laevulose ersetzt war und wozu soviel Äpfelsäure hinzugesetzt wurde (10 cm^3 Normallauge notwendig für Neutralisation von 100 cm^3 angesäuerter Würze), dass dadurch die Gärung erheblich verlangsamt und das für jede Zelle erreichbare Luftquantum also vergrössert wurde. Die in Fig. 3 dargestellten Gestalten kann man deshalb als die aërobe Gärform des Fermentes bezeichnen. Wie man sieht, besteht die anaërobe Gärform vorwiegend aus länglichrunden, seltener ganz kugeligen Zellen, welche auf die gewöhnliche Weise durch Teilung entstehen, durch Scharnierbewegung eigentümliche, ziemlich lange, zusammenhängende Dyaden erzeugen, worin nicht selten schon vor dem Freiwerden der Zellen die neuen Teilwände sichtbar werden, wodurch sehr charakteristische Tetraden entstehen (Fig. 2 unten). Die achtzähligen Zellfamilien, welche sehr oft in solchen Kulturen vorkommen, können sowohl aus jenen Tetraden entstehen, wenn diese vor dem Auseinanderfallen noch eine Teilung erfahren, wie auch direkt aus den achtsporigen Ascen, indem die Sporen, bei der Auskeimung, lange miteinander verklebt bleiben. In Fig. 2, welche sich auf eine Gärung

bezieht, wobei mit Material, welches Ascosporen enthielt, geimpft war, kommen beide Fälle vor. Es ist eine allgemeine Regel, dass die Zellen unserer Art in den Gärungen ziemlich lange Zeit zu Familien verbunden bleiben, welche nicht selten aus 12, ja 20 Einzelzellen bestehen. Die dadurch entstandenen kleinen Flöckchen sind leicht mit der Lupe zu erkennen; sie sind sehr schwer und setzen sich schnell ab, so dass eine vollständige Trennung der gärenden Flüssigkeit von der Hefe auch ohne Filtrieren gelingt. Ganz lose Zellen werden in den Gärungen nur relativ selten angetroffen. Die Grösse der Gärform ist etwas verschieden, je nach der Ausgiebigkeit der Lüftung. Die in Fig. 2 gezeichneten Zellen stimmen mit mittelgrossen Bierhefezellen überein, sie messen ca. 7½—8 μ. In Fig. 3, wo die Lüftung eine reichlichere war, ist die Grösse beträchtlicher, jedoch auch viel ungleicher für verschiedene Zellen. Die Zellen dieser Figur messen etwa 7—9 μ in der Dicke und werden bis 18 μ lang. Solche grosse Zellen sind immer im Begriff, Ascosporen zu erzeugen, wie in der in Fig. 3 dargestellten Gärung auch zahlreiche Ascen vorkamen.

Wenn man in eine mit Octosporus geimpfte Würze Luft hineinbläst, so wird das Wachstum sehr gefördert und man erntet daraus ein Gemisch, welches der Hauptsache nach aus Ascen und nur zum kleineren Teil aus vegetativen Zellen besteht. Fleischwasser mit Glukose versetzt, ist eine gute Gärflüssigkeit für Octosporus und erzeugt ähnliche Zellformen, wie Laevulosewürze, worunter zahlreiche Ascen vorkommen.

3. Die Ascosporenbildung.

Schizosaccharomyces zeigt in vielen Beziehungen Verwandtschaft zu der Bierhefe und muss ohne Zweifel zu den Saccharomyceten gebracht werden, wenn auch durch die Entdeckung unserer neuen Gattung die alte Diagnose von Saccharomyces nicht länger aufrecht zu erhalten ist. Die Homologie der Ascosporen von Saccharomyces mit denjenigen der übrigen Ascomyceten ist durch das Verhalten von Schizosaccharomyces aus der Dunkelheit, welche darüber in der letzten Zeit geworfen wurde, wieder ins rechte Licht gestellt und damit ist die Frage nach dem Vorkommen eines Zellkernes bei Saccharomyces in ein neues Stadium getreten, weil der Zellkern bei Schizosaccharomyces zwar schwierig zu finden ist, jedoch unzweifelhaft vorkommt, so dass der gleiche Schluss für Saccharomyces gezogen werden muss.

Der Zellkern von Octosporus liegt bei den jungen Ascen irgendwo in der Mitte der Zelle, ganz nahe der Zellwand als kleines durchsichtiges Körperchen ohne sichtbare Struktur (Fig. 4). An dieser Stelle wird die Zelle gewöhnlich quer durchsetzt durch eine ziemlich dicke Protoplasmaplatte (Fig. 3, 4, 5), wodurch der Zellraum in zwei grosse Vakuolen geteilt wird, in welchen dann noch feinere Protoplasmabänder und Arme vorkommen können. Im Protoplasma liegen auch zugleich kleine Vakuolen, welche nur schwierig von Zellkernen zu unterscheiden sind, da sie sich ziemlich stark durch Farbstoffe färben, wohl infolge der Gegenwart von zahllosen kleinen, oft in Molekularbewegung verkehrenden Teilchen. Ferner liegen im Protoplasma Granula von sehr verschiedener Grösse zerstreut.

In der mit Äpfelsäure und Laevulose versetzten, früher besprochenen Würze sah ich in den meisten Vegetationszellen eine scharf abgegrenzte seitliche Anhäufung des

Protoplasmas (Fig. 3), worin in manchen Fällen der eingeschlossene Zellkern erkannt werden konnte.

Der Zellkern ist zweifellos die Grundlage, wovon die Ascosporenbildung ausgeht, acht Kerne sind die Vorläufer der acht Ascosporen. Da die Kerne aus dem ursprünglichen Zellkerne entstehen, so können auch Zellen mit 2 und 4 Kernen angetroffen werden, doch finden die successiven Teilungen so schnell statt, dass es nicht leicht ist, diese Übergangsstadien anzutreffen. Die jungen Kerne und die daraus entstehenden Ascosporen bleiben gewöhnlich dicht nebeneinander in einem Haufen vereinigt liegen, können aber auch durch das Protoplasma an die verschiedensten Stellen der Zelle geführt werden.

Die reifen Ascosporen (Fig. 6) sind Kugeln von 4½ μ Mittellinie. Sie besitzen einen deutlichen Kern und bei starker Vergrösserung (Fig. 7) ergibt sich, dass das Protoplasma rings um diesen Kern eine strahlenförmige Anordnung besitzt.

Die Auskeimung der Ascosporen ist sehr leicht zu beobachten, da dieselbe bei reichlicher Ernährung innerhalb der Ascen stattfindet. Dieselbe besteht einfach in einer Anschwellung (Fig. 8) und wird, wenn die normale Zellgrösse erreicht ist, durch die Teilung nachgefolgt. Eine Abstreifung der Sporenwand findet nicht statt. Schon wenn die erste Teilung stattfindet, ist die Ascuswand durch den inneren Druck zerrissen und der zusammenhängende 8-zählige Zellkomplex wird frei. Erst später verlassen die Zellen einander.

Wie man sieht, ist dieser Vorgang etwas verschieden von dem, was man bei Saccharomyces findet, wo die zunächst aus den Sporen sich entwickelnde gekrümmte Zellgestalt eine charakteristische, von den erwachsenen Stadien abweichende ist.

Obschon alle Zellen sich schliesslich in Ascen verwandeln, glaube ich nicht, dass der Ascus eine notwendige morphologische Entwicklungsphase ist. Vielmehr spricht alles dafür, dass die vegetative Vermehrung ununterbrochen stattfinden kann, wenn dafür nur günstige Bedingungen obwalten und dass die Ascosporen nur ein Verbreitungs- und Dauerorgan darstellen, welches den Zellen eine besondere Lebenszähigkeit verleiht und gegen Austrocknen widerstandsfähig macht. Es ist leicht, durch Versuche festzustellen, dass sie wenigstens in letzterer Beziehung den vegetativen Zellen weit überlegen sind.

Nirgendwo ist es klarer wie hier, dass der Ascus und die Ascosporen ohne einen Sexualakt entstehen.

4. Gärungserscheinungen und Ernährung.

Die Turgorkraft von Sch. octosporus ist eine sehr geringe, schon der mechanische Widerstand einer 7-proz. erstarrten Gelatine ist für das Wachstum ein so erheblicher, dass die auxanographische Untersuchung, welche auf das Einschliessen der Zellen in Gelatine beruht, hier nicht durchführbar ist. Zur Feststellung der Ernährungsbedingungen muss deshalb der etwas umständlichere Weg der flüssigen Kulturen eingeschlagen werden. Dabei lernt man zu gleicher Zeit die Gärungserscheinungen kennen.

In Bezug auf die assimilierbaren Formen des Stickstoffes ist Sch. octosporus sehr wählerisch. Mit Ammonsalzen und Asparagin konnte unter übrigens

den besten Bedingungen nur ein kaum merkbares Wachstum erreicht werden. Selbst Pepton siccum, welches für die Bierhefe eine ausgezeichnete Stickstoffquelle darstellt, erlaubt nur sehr schwaches Wachstum. Nur die natürlichen Stickstoffverbindungen, wie sie im Malze und in Rosinen gefunden werden, sind als die eigentlichen Bezugsquellen des Stickstoffs aufzufassen. Sind diese Körper vorhanden, dann lässt sich leicht feststellen, welches die übrigen Ernährungsbedingungen sind. Wie zu erwarten, liegt hier das dualistische Schema vor: Nur dann findet Vermehrung statt, wenn irgend ein Kohlehydrat als Kohlenstoffquelle auftreten kann. Auch in Bezug auf letztere ist unsere Hefe jedoch in ihrer Wahl sehr beschränkt, nur Glukose, Laevulose und Maltose verursachen kräftiges Wachstum, Mannit und Glycerin nur ein sehr schwaches, Rohrzucker, Erythrit, Milchzucker, Raffinose, Dulcit, Quercit, Arabinose und Inosit durchaus keines. In Bezug auf den Rohrzucker hat dieses Resultat mich überrascht. Alle bisher bekannten Hefen, welche kräftig Maltose assimilieren, können auch Rohrzucker zu ihrem Wachstume verwenden. Octosporus ist von dieser Regel die erste Ausnahme und wieder ein Beweis für die sehr speziellen Beziehungen der Hefen zu den Zuckerarten.

Was nun mehr im besonderen die Gärung betrifft, so ergibt sich, dass aus dem assimilierten Zucker immer auch nebenbei Alkohol entstehen kann, nur für Mannit, welcher auch auf das Wachstum überhaupt nur schwach wirkt, konnte das nicht festgestellt werden. Glukose, Laevulose und Maltose veranlassen sogar kräftige, wenn auch viel langsamer wie bei Bierhefe verlaufende Gärungen. Die Beziehungen zum freien Sauerstoff sind hier ähnlich wie beim Kahmpilze: Nur untergetauchte Zellen, welche mit Sauerstoff getränkt sind, können auch im sauerstofffreien Raume Gärung verursachen. Dasselbe Verhalten trifft zwar ebenfalls für Bierhefe zu, jedoch mit dem Unterschiede, dass die Bierhefezelle viel weniger gespeicherten Sauerstoff für Gärung und Wachstum braucht, wie Kahmpilze und Octosporus. Lebhafte Gärungen, wie man solche am besten erhält in mit 3—5 Proz. Glukose oder Laevulose versetzter und angesäuerter Malzwürze, besitzen einen sehr eigentümlichen, nicht eben angenehmen Geruch, und das dabei entstehende Bier ist zwar ebenfalls charakteristisch, doch für meinen Geschmack entschieden schlecht. Geschmackssachen sind jedoch so relativ, dass ich nicht behaupten will, Octosporus sei für die Bereitung eines neuen gegorenen Getränkes unbrauchbar. Der abdestillierte Alkohol ist der gewöhnliche Äthylalkohol; die darin vorkommenden Verunreinigungen sind jedenfalls teilweise charakteristisch.

Als Lufthefe in gewöhnlicher gekochter Malzwürze in Reinkultur kultiviert, ist der Ertrag an trocken abgepresster Presshefe (mit 75 Proz. Wassergehalt) ca. 30 Proz. in Bezug auf das Gewicht der verwendeten Gerste. Für einen Laboratoriumsversuch ist das eine sehr hohe Ausbeute, da man unter gleichen Bedingungen von Bierhefe höchstens 22 Proz. in Bezug auf das Gewicht des verwendeten Getreides ernten kann. Demgegenüber ist jedoch die Gärzeit bei Octosporus, auch bei starker Lüftung (welche das Wachstum ganz überraschend fördert), noch 12 Stunden länger wie bei Bier- und Weinhefe, und das Saccharometer kommt in einer Octosporusgärung nur schwierig von 10° auf 4° Balling, während es bei Bierhefe schnell 1° à 2° (in der gekochten Würze in Reinkultur) zurückgeht. Natürlich ist der Alkoholgehalt solcher vergorener Würze gering und erreicht höchstens 0,7 Proz. in Bezug auf die Gärflüssigkeit.

Bringt man die abgepresste Hefe in Brotteig und vergleicht nach dem üblichen Verfahren die Triebkraft mit derjenigen von gewöhnlicher Presshefe von guter Qualität, so findet man, wenn die Kohlensäureentwicklung pro Zeiteinheit bei letzterer auf 100 gestellt wird, für frische Octosporushefe höchstens 60.

Delft, 14. Mai 1894.

Figurenerklärung.

Alles bezieht sich auf Schizosaccharomyces octosporus.

Vergrösserung Fig. 1, 2, 3, 4, 6 und 8 tausendfach, Fig. 5 und 7 zweitausendfach.

Fig. 1 (1000). Sehr junge Zellen aus Kolonieen auf Würzegelatine. Teilung, Kappenbildung, »Scharnierbewegung« und Zellpaare.

Fig. 2 (1000). Kräftige Gärung in sauerer Glukosewürze. Unten in der Figur Dyaden, Tetraden und Oktaden.

Fig. 3 (1000). Gärung in stark sauerer Laevulosewürze. In den meisten Zellen eine seitliche Protoplasmaanhäufung, worin der Zellkern.

Fig. 4 (1000). Ascen in verschiedenen Stadien der Ascosporenbildung. Die Kappen deutlich sichtbar.

Fig. 5 (2000). Mit Pikrinsäure fixierter junger Ascus.

Fig. 6 (1000) und 7 (2000). Ascosporen in Freiheit gestellt.

Fig. 8 (1000). Keimung der Ascosporen durch Anschwellung.



Fig. 1.



Fig. 2.



Fig. 3.

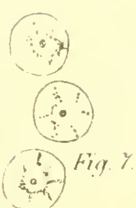


Fig. 7.



Fig. 5.

Fig. 6

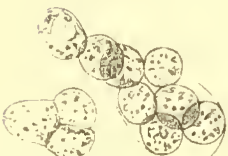




Fig. 8

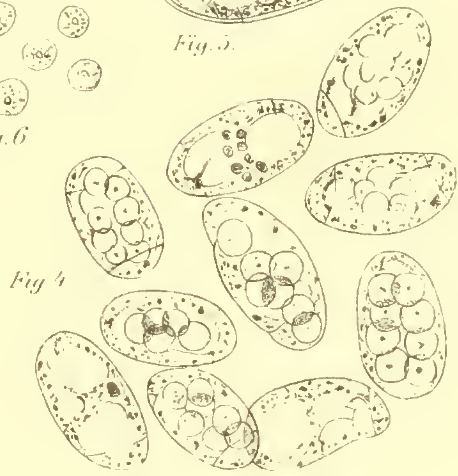


Fig 4

Sur la fermentation et le ferment butyliques.

Archives Néerlandaises des Sciences Exactes et Naturelles, Haarlem, Tome XXIX, 1896, p. 1—68. — Verscheen onder den titel »Ueber die Butylalkoholgärung und das Butylferment« in Verhandelingen Kon. Akademie van Wetenschappen, Amsterdam, Tweede sectie, Deel I, No. 10, 1893.

Le produit principal de cette fermentation est l'alcool butylique normal, qui bout à 117° C et se dissout dans 12 parties d'eau, d'où l'on peut le séparer au moyen de chlorure de calcium. L'oxydation le convertit en acide butyrique normal. Cet alcool ne prend pas seulement naissance dans la fermentation qui va être traitée dans les pages suivantes et dont je propose d'appeler le ferment *Granulobacter butylicum.* Il s'en rencontre encore de petites quantités dans les produits d'autres fermentations, surtout dans la fermentation butyrique du glucose, du saccharose, de la glycérine et de la mannite, due à ce que j'appellerai le *Granulobacter saccharobutyricum* [1]). Le même alcool se forme encore dans la fermentation butyrique causée par le *Bacillus orthobutylicus,* décrite par M. Grimbert [2]). On trouve répandu dans le terreau des jardins une bactérie en forme de streptococque, qui élabore une petite quantité d'alcool butylique aux dépens d'extraits concentrés renfermant du maltose. J'ai rencontré de plus dans une culture ensemencée au moyen de terre du Sénégal, apportée en même temps que des noix d'arachide, outre de nombreuses colonies de *Bacillus megatherium,* un clostridium qui donna passagèrement dans les brassins de malt une grande quantité d'alcool butylique. Je crois donc qu'en le recherchant attentivement, cet alcool se montrerait être un produit très-répandu de la vie bactérienne. Le ferment que je décrirai dans la suite de ce travail n'a pas été distingué jusqu'ici du ferment butyrique, auquel il est en effet étroitement allié. Je donnerai plus loin une diagnose de ce dernier ferment, et je compte encore y revenir ultérieurement, à propos d'une étude générale des fermentations spontanées dans les pâtes de farine préparées à la température ordinaire, quand on les abandonne à elles-mêmes dans l'étuve d'incubation.

§ 1. Introduction. Création du genre Granulobacter.

J'ai découvert en 1886 qu'il y a certaines variétés de farine de céréales et de malt d'orge, qui trempées au moyen d'eau bouillante, entrent au bout d'un séjour de

---

[1]) A. Fitz. Ueber *Bacillus butylicus. Ber. d. D. chem. Gesellsch.*, Jahrg. 15, pag. 867. 1882. Le *Bacillus butylicus* Fitz est identique à mon *Granulobacter saccharobutyricum.* Feu M. Fitz ne connaissait pas mon *Gr. butylicum,* ce que je puis affirmer avec certitude, vu que les nombreux tubes contenant le *Bacillus butylicus* Fitz, et préparés par l'auteur lui-même, sont passés dans mes mains à sa mort en 1885.

[2]) L. Grimbert. Fermentation anaérobie produite par le *Bacillus orthobutylicus, Ann. de l'Inst. Pasteur.* T. 7, p. 353, 1893. Ce bacille ne produit pas de granulose et ne se colore pas en bleu par l'iode.

24 heures à la température d'incubation en fermentation butylique pure, avec formation abondante d'hydrogène et d'acide carbonique. D'autres échantillons de farine, traités de la même manière, donnent outre les gaz cités et une très-petite quantité d'alcool butylique, surtout de l'acide butyrique [1]).

L'opération du détrempage a pour but de tuer le ferment lactique, de chasser l'air de la masse et de transformer la fécule en empois. Le ferment butylique, le ferment butyrique et les bactéries du foin, dans le sens le plus étendu de cette dernière dénomination, survivent. Les spores du ferment butylique et de la bactérie butyrique en effet résistent pendant quelques secondes à une ébullition prudente. Comme ces spores donnent naissance à des bactéries anaérobies obligatoires, le développement a lieu d'abord dans la profondeur de la pâte. Les bactéries secrètent en cet endroit une grande quantité d'amylase [2]), ce qui liquéfie la fécule transformée en empois et la fait passer à l'état de maltose [3]).

On sait que les bactéries du foin sont très-résistantes à l'ébullition. Il se forme donc à la surface libre de la bouillie de farine une pellicule de bactéries du foin, qui d'ailleurs n'est pas nuisible à la fermentation butylique; elle empêche en effet le contact de l'air et favorise donc bien plutôt la fermentation qui s'opère en dessous d'elle.

Je me suis depuis cette année 1886 souvent occupé de ces remarquables phénomènes, et j'ai appris à avoir si bien dans la main les facteurs principaux qui déterminent l'expérience que peu à peu le nombre d'espèces de farine avec lesquelles elle a réussi s'est considérablement accru.

C'est ainsi que j'ai obtenu encore, quoique exceptionnellement, de bonnes fermentations avec la farine de seigle de froment, d'épeautre et d'orge. La quantité d'alcool butylique récoltée est extraordinairement variable, et dépend chaque fois des espèces et variétés de bactéries en jeu. Le plus souvent on trouve dans de la farine de cette nature une si grande quantité de ferment butyrique qu'il détruit la bactérie butylique. Ce qui me donne à beaucoup près les meilleurs résultats, ce sont des espèces d'orge d'été nue *(Hordeum distichum nudum* et *H. vulgare himalayense),* cultivées dans un jardin à Delft [4]) et sur lesquelles le ferment butyrique semble faire entièrement ou presque entièrement défaut. Puis vient l'épeautre, puis le seigle et finalement le froment et l'orge ordinaires, sur lesquels le ferment butyrique semble être plus ou

---

[1]) Jamais je n'ai pu constater dans ces deux fermentations, en dépit de très-nombreuses analyses de gaz, la présence d'une trace de méthane ou de quelque autre substance gazeuse sauf l'hydrogène et l'acide carbonique. Une lessive de potasse et le noir de palladium absorbent complètement les gaz de fermentation.

[2]) L'expression d'»amylase« est employée ici, à l'exemple des auteurs français, comme nom générique pour les diverses zymases qui décomposent l'amidon (action amylolytique). J'ai appris à connaître de plus près les espèces suivantes d'amylase: I la maltase et II la granulase d'orge (qui constituent ensemble la diastase du malt); III la ptyaline (et la diastase pancréatique); IV les autres granulases (comprenant les diastases du malt de maïs, butylique, du sarrasin, des Nyctaginées); V la glucase.

Les expressions granulase butylique, diastase butylique, amylase butylique, diastase granulobactérienne, qui se rencontreront dans la suite de ce travail et dans la littérature, s'expliquent d'elles-mêmes: elles s'appliquent toutes au même ferment amylolytique produit par le *Granulobacter.*

[3]) Il n'y a pas production de glucose.

[4]) Mes observations s'appliquent à des matériaux récoltés en 1887, 88, 89, 90, 91 et 92.

moins accumulé, dans l'ordre où je les cite. Même la farine de froment pure, telle qu'on la trouve dans le commerce, m'a donné quelques bons résultats.

Il n'est peut-être pas superflu d'examiner brièvement la question de l'origine du ferment butylique que l'on trouve sur les espèces de céréales nommées. Je ne suis cependant pas en mesure d'y répondre définitivement. Si le ferment tombe sur les épis sous forme de poussière, on se demandera, d'où provient cette poussière? Le ferment butyrique d'autre part, le *Granulobacter saccharobutyricum*, est extraordinairement abondant dans le sol, et il semble donc tout donné d'admettre que le sol est également le milieu naturel primitif du ferment butylique. Mais pourquoi ce dernier se rencontre-t-il si souvent sur l'orge nue sans être mélangé au ferment butyrique, tandis que les variétés ordinaires d'orge, de seigle ou de froment portent toujours à la surface de leurs grains le *Gr. saccharobutyricum* en quantité telle que bien rarement on peut y provoquer des fermentations butyliques? Je ne puis résoudre cette question d'une manière certaine. Le *Gr. saccharobutyricum* peut-il, dans certaines circonstances inconnues, se transformer en *Gr. butylicum?* C'est ce que je ne puis décider. Cette métamorphose ne s'opère pas dans le laboratoire; mais on observe parfois qu'un échantillon bien conservé d'orge nue, qui peut donner immédiatement après la récolte la fermentation butylique, perd cette propriété en hiver et ne permet plus alors que le développement du seul *Gr. saccharobutyricum*. Je me suis donc demandé si le *Gr. butylicum* vit peut-être en parasite à l'intérieur des grains de blé et meurt facilement dans la farine? Mais il n'en est pas ainsi; les spores ne se trouvent sans le moindre doute qu'à la surface extérieure du fruit [1]). Il est donc encore obscur pourquoi le ferment butylique se développe de préférence dans les bouillies pâteuse d'orge nue.

Le riz, le maïs, le sarrasin, le caroubier (gousses du *Ceratonia siliqua)* et le sorgho ne m'ont jamais donné de fermentations butyliques abondantes. Toujours en effet ces matériaux entrent en fermentation butyrique. Le ferment butylique cependant n'y fait pas défaut, et c'est donc dans leurs propriétés chimiques qu'il faut chercher l'explication du phénomène. Je l'attribue à la présence de glucose, qui se trouve tout formé dans le caroubier, et se forme facilement aux dépens de la farine de riz, de maïs, de sarrasin et de sorgho, renfermant tous une grande quantité du ferment la glucase. Or le glucose passe facilement à l'état d'acide butyrique, mais bien plus difficilement à celui d'alcool butylique.

Pour que les expériences de fermentation butylique réussissent avec les farines de seigle, de froment, d'épeautre et d'orge, il faut que la température soit exactement maintenue à un certain degré constant, non seulement lors de la trempe, mais encore dans l'étuve d'incubation. Des oscillations de température de 5° C à l'intérieur de celle-ci peuvent provoquer la formation d'acide butyrique, et faire manquer ainsi l'expérience. Cela doit sans nul doute tenir à ce que les spores du ferment butyrique se trouvent en très-grande quantité à la surface des grains de ces céréales, à côté des

---

[1]) Des questions de cette nature sont bien plus faciles à résoudre qu'on ne le croit généralement. Il suffit de placer les grains, ou des portions de grains, enfermés dans de la gaze ou dans une autre enveloppe appropriée, au sein des milieux de fermentation ou des matérieux d'ensemencement. On recherche ensuite les bactéries dans des préparations microscopiques; jamais on ne trouvera ces organismes dans l'intérieur des tissus ou tout au moins dans des cellules closes. Le *Granulobacter* ne pénètre donc pas dans les cellules intactes.

spores du ferment butylique, et que l'optimum de température pour la première bactérie est un peu plus bas que pour l'autre. De là une prépondérance très-rapide d'une espèce sur sa voisine. Quoiqu'il en soit, j'ai réussi, par la méthode à la gélatine, à isoler d'une pâte préparée de la manière indiquée les deux formes, ce qui m'autorise, me semble-t-il, à admettre leur existence à la surface des fruits de céréales.

Les bactéries dont il faudra tenir compte ici n'ont jamais été suffisamment distinguées entre elles. Elles ont jusqu'ici toutes été comprises sous les noms de *Bacillus Amylobacter* et de *Clostridium butyricum*. Je crois que le moment est venu de supprimer ces appellations collectives et de créer à la place quelques espèces nouvelles [1]). J'ai eu moi-même l'occasion, outre les deux espèces déjà citées et leurs diverses variétés, d'en distinguer encore une troisième, souvent rencontrée et en grande quantité, savoir le ferment butyrique du lactate de calcium. Toutes trois ont ceci de commun qu'elles ne se développent pas du tout quand il y a beaucoup d'oxygène en présence; et que si dans les milieux de fermentation il n'y a que des traces de ce gaz, il se produit des bâtonnets à motilité très énergique, qui se colorent en jaune par l'iode et donnent avec une vive effervescence de l'hydrogène et de l'acide carbonique. L'anaérobiose est-elle complète, une certaine partie du corps de plusieurs bâtonnets se remplit de granulose, qui se colore en bleu par l'iode. Les bâtonnets augmentent en même temps considérablement de volume et se transforment en clostridiums. Je propose pour cette dernière raison de réunir dorénavant la totalité de ces formes sous le nom générique de *Granulobacter*.

Je crois devoir rapporter encore à ce genre une espèce aérobie (temporairement anaérobie), connue jusqu'ici sous le nom de *Bacillus Polymyxa*, et que j'ai également étudiée en détail. On aura alors comme suit un aperçu général des quatre formes que j'ai plus spécialement eues sous les yeux.

Granulobacter. Bactéries de fermentation anaérobies temporaires ou obligatoires [2]),qui si l'anaérobiose est complète se remplissent soit en partie soit en totalité de granulose et prennent alors la forme de clostridiums. S'il y a des traces d'oxygène en présence il se forme des bâtonnets à motilité très-vive, qui se colorent en jaune par l'iode. Des spores se ferment dans les clostridiums, et peuvent résister pendant quelques secondes ou quelques minutes, dans les liquides de culture, à une température de 95—100° C. Cela permet de supprimer les bactéries étrangères. On trouve toujours, parmi les produits de fermentation, de l'acide carbonique et d'ordinaire aussi de l'hydrogène, tandis que le méthane fait complètement défaut.

Les quatre espèces principales sont les suivantes.

En premier lieu: le *Granulobacter butylicum* [3]).

C'est le ferment butylique de plusieurs variétés de farine de céréales. Il est très-abondant à la surface de l'orge nue, et donne aux dépens du maltose de l'alcool butylique, de l'hydrogène et de l'acide carbonique, mais pas d'acide butyrique. Il est exclusivement anaérobie. Pendant la fermentation il y a production de beaucoup

---

[1]) C'est ce qu'a déjà ébauché M. M. Gruber, en divisant le *Clostridium butyricum (Bacillus Amylobacter)* en trois espèces, qu'il décrit brièvement sous les chiffres I, II et III. *Centralblatt für Bacteriologie* Bd. I. p. 370, 1887.

[2]) Je renvoie pour l'explication de l'expression anaérobie temporaire au § 12.

[3]) Peut-être identique au *Bacillus Amylobacter* I de M. Gruber. (Voir le note de la page précédente.)

d'amylase, qui est un composé simple, et ne renferme pas non plus de glucase. Les spores sont grandes; les clostridiums épais et courts. Les colonies apparaissant dans l'extrait de malt gélatiné sont blanches, d'une consistance mucilagineuse épaisse et ne liquéfient pas (Pour les figures 6 et 7 v. pag. 35 et 39).

En deuxième lieu: le *Granulobacter saccharobutyricum* [1]).

C'est le vrai ferment butyrique du sucre. On le trouve toujours dans la farine et dans la terre des jardins; il est également très-commun dans le limon des fossés. C'est le ferment anaérobie de la fermentation butyrique ordinaire du glucose. La fermentation butyrique du maltose par le même organisme est plus difficile. Il produit, outre de l'acide butyrique de fermentation, de l'alcool butylique en quantité variable ainsi que de l'acide carbonique et de l'hydrogène. Pendant la fermentation il y a formation d'amylase. Cette forme est très-voisine de l'espèce précédente, ce qui ne permet pas toujours de les distinguer au microscope. Les bâtonnets cependant prennent ici la prépondérance, de manière que dans l'ensemble l'analogie aux bacilles du foin est encore plus grande. Les clostridiums sont généralement plus minces que dans la première forme, et les spores plus petites; l'organe qui produit la granulose est également plus petit. Les colonies se développent plus lentement dans l'extrait de malt gélatiné, sont d'un moindre volume et ne deviennent pas si résistantes que chez le *G. butylicum*. Ne liquéfie pas la gélatine.

En troisième lieu: le *Granulobacter lactobutyricum* [2]).

C'est le ferment butyrique du lactate de calcium qu'il transforme, à l'état de clostridium anaérobie, en butyrate de calcium, hydrogène et acide carbonique avec quelques produits accessoires inconnus, mais pas de méthane (fig. 1). Il perd très-facilement son pouvoir fermentatif et passe alors à l'état d'une bactérie en bâtonnet, qui ressemble au *Bacillus subtilis*, mais décompose énergiquement au début le lactate de calcium, avec formation de carbonate de calcium, sans acide butyrique. Cette forme aérobie liquéfie faiblement la gélatine, ne se métamorphose pas en les espèces précédentes et ne se developpe pas dans leurs solutions nutritives. Les clostridiums sont ordinairement très-courts et épais; ils ne se meuvent que lentement; les spores qu'ils renferment sont petites, plus arrondies que chez le ferment butylique. La granulose prend par l'iode une teinte bleu violet et non bleu pur. La forme aérobie contient des spores disposées en chapelet; on n'y trouve pas de granulose et elle prend par l'iode une teinte jaunâtre. Le carbonate de calcium formé aux dépens du lactate se compose de grands sphérites très-intéressants (v. Fig. 1). Au bout de quelques transports suc-



Fig. 1. (700) *Granulobacter lactobutyricum*, avec sphérites de carbonate de chaux.

[1]) Identique au *Bacillus butylicus* Fitz, *Ber. d. D. chem. Gesellsch.*, Jahrg. 15, pag. 867, 1882. A. de Bary en donne une bonne figure sous le nom de *Bacillus Amylobacter* dans ses Vorlesungen über Bacterien, 1re édit. pag. 79, 1885.

[2]) Pasteur. Etudes sur la bière, p. 282, 1876.

cessifs le developpement cesse complètement en présence de l'air. La forme anaérobie ne donne également que quelques fermentations et meurt au bout de quelques transports, sans que l'on puisse dire pourquoi. On rencontre cette forme dans les fermentations butyriques spontanées du lactate de calcium.

En quatrième lieu: le *Granulobacter Polymyxa* [1]):

Bactérie temporairement anaérobie, provoquant la fermentation de l'extrait de malt (Fig. 2). Elle se développe le mieux quand l'air a libre accès, mais ne fermente qu'en présence d'une quantité restreinte d'oxygène. La forme aérobie ne se compose que de bâtonnets mobiles, la forme de fermentation est représentée par de clostridiums renfermant peu de granulose et le plus souvent des spores. Cet organisme produit un mucilage blanc volumineux. Il ne donne à la fermentation presque rien que de l'acide carbonique, une très-petite quantité d'hydrogène, de simples traces d'alcool butylique et pas d'acide butyrique. Il liquéfie lentement, mais complètement, la gélatine nutritive, et donne naissance à un peu diastase. C'est un hôte constant des pâtes en fermentation butylique, et il doit donc sans nul doute se trouver normalement sur les grains de blé. Il est très-répandu dans le terreau de jardin. Il forme la transition des *Granulobacter* aux »bacilles du foin.«

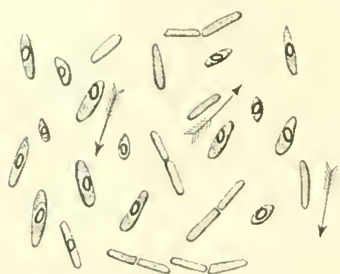


Fig. 2 (700) *Granulobacter Polymyxa.*

La série des Granulobactéries n'est pas épuisée par ces quatre espèces. J'ai rencontré au moins encore deux formes que je n'ai pas réussi jusqu'ici à cultiver; l'une provient de la fange de fossé, l'autre s'est rencontrée sur les grains de blé. Je crois également probable que le *Leptothrix buccalis* du dépôt dentaire doit être rapporté au genre *Granulobacter.*

Dans la poussière de céréales orientales se rencontrent du reste des espèces alliées au *Gr. Polymxa,* espèces aérobies très-remarquables qui produisent des spores, forment des zooglées très-résistantes et renferment du glycogène au lieu de granulose.

Le *Granulobacter* trouvera, comme il a déjà été dit, sa place dans le système naturel futur à côté du groupe passablement étendu des bacilles du foin et de la pomme de terre.

Il se pourrait d'autre part que le *Granulobacter* soit, au point de vue systématique, allié à la bactérie de la putréfaction intestinale découverte par M. Bienstock, le *Bacillus putrificus coli,* et allié également aux autres bactéries sporogènes provoquant la putréfaction des matières albuminoïdes. Peut-être le *Granulobacter* représente-t-il le type le plus différentié du système bactérien.

Comme il a déjà été dit plus haut, le *Granulobacter butylicum* est une espèce qui comprend dans tous les cas un certain nombre de variétés très-proches parentes les unes des autres. Il en est de même du *Gr. saccharobutyricum.* L'existence de ces variétés, qui occupent souvent une position intermédiaire entre les deux espèces, rend beaucoup plus difficile l'étude de ces dernières, et aussi la description et l'explication des

[1]) Prazmowski, Entwicklung und Fermentwirkung einiger Bacterien, p. 37, Leipzig 1880.

phénomènes provoqués par elles. Je me suis donc décidé à ne traiter dans ce travail que du ferment butylique qu'il y a moyen de caractériser nettement; et cela malgré que le *Gr. saccharobutyricum* soit plus généralement répandu, supplante facilement dans les moûts de farine de céréales le *Gr. butylicum,* et soit donc plus important au point de vue pratique. L'antagonisme entre les deux ferments repose avant tout sur la facilité avec laquelle le *Gr. saccharobutyricum* fabrique de l'acide butyrique aux dépens du glucose; cet acide est nuisible au ferment butylique. Les pâtes de maïs, de sorgho, de riz et de sarrasin, qui renferment du glucose, sont donc très-favorables au développement du *G. saccharobutyricum,* mais impropres au *G. butylicum.*

Le caroubier renferme également les spores des deux ferments. Les traités de chimie le recommandent cependant pour la fabrication de l'acide butyrique. L'explication de ce fait est donnée, comme nous l'avons vu, par la forte teneur en glucose, que le *Gr. saccharobutyricum* transforme en acide, ce qui arrête dans son développement le *G. butylicum.*

§ 2. Le levain butylique.

Dans l'industrie de la levûre, le moût qui devra fermenter est tantôt directement additionné de levûre de pain; c'est ce qu'on appelle en allemand »Hefeansatz«. Ou bien, dans les fabriques les mieux montées, le moût est additionné de »Kunsthefe«. On entend par là une pâte épaisse très-consistante de farine de seigle et de malt d'orge, qui après saccharification à la température d'action de la diastase, entre en fermentation lactique spontanée. On obtient ainsi le »Sauergut« ou »Hefegut« des Allemands qui, additionné de levûre, fournit après fermentation la »Kunsthefe«. La levûre donne dans le »Sauergut« une fermentation absolument anaérobie et se débarrasse ainsi presque complètement des microbes entièrement ou à moitié aérobies [1]).

Le levain butylique dont je me sers pour provoquer la »fermentation principale« dans les moûts appropriés a un but analogue; seulement je n'ai pas besoin de la saccharification par le malt, puisque le ferment secrète lui-même de la diastase. Je ne dois pas non plus ajouter de bactéries butyliques, car celles-ci, se rencontrent déja sur les céréales tandis que la vraie levûre de pain y fait généralement défaut. Il faudrait donc à vrai dire, pour établir un parallèle exact, comparer le levain butylique à la pâte de malt de seigle devennue spontanément acide, c'est-à-dire au »Sauergut«.

Pour me procurer le levain butylique, je fais bouillir vivement 50 à 100 cm^3, d'eau distillée, sur bain de sable, dans un verre long et étroit, et je continue l'ébullition jusqu'à ce que l'air dissous soit complètement chassé. J'ajoute ensuite peu à peu des cuillerées de la farine grossièrement moulu, non tamisée, d'orge nue, jusqu'à ce que la masse soit devenue épaisse et que la cuiller puisse s'y tenir debout. Il ne faut pas cependant que la pâte soit trop consistante, sinon les bactéries butyliques doivent mettre plus de temps à se développer et à secréter de l'amylase avant d'avoir envahi suffisamment la masse et de mettre celle-ci toute entière en fermentation. On fait bien attention que, pendant toute l'expérience, l'ébullition soit très-modérée, de manière

---

[1]) La »Kunsthefe« est issue sans aucun doute dans le cours des progrès industriels du »Sauerteig« (l'équivalent littéral du »levain« français) qui se distingue du »Sauergut« par ce qu'il renferme de la levûre, tandis qui ce dernier n'en contient pas.

que les dernières portions de farine ne restent soumises que durant quelques secondes à une température de 100° C. On recouvre alors le vase d'une plaque de verre et on le porte immédiatement dans un thermostat à 35—37° C. Le refroidissement y a lieu d'une manière très-lente, et si l'on examine attentivement la culture au bout d'une douzaine d'heures, on trouvera déjà quelques bulles gazeuses en signe de fermentation commençante. Celle-ci peut déjà être vive au bout de 24 heures, et après 36 heures on commence à percevoir l'odeur un peu enivrante, mais nullement désagréable, de l'alcool butylique. Cette odeur s'accentue de plus en plus pendant quelques jours. Si l'on a eu la main heureuse dans le choix de l'échantillon de céréale, — et cela arrivera le plus souvent (mais pas toujours) avec de la farine fraîche d'orge nue, — souvent on obtient aussitôt une véritable fermentation pure. Les bacilles du foin peuvent être en effet complètement arrêtés dans leur développement ou même faire défaut. Certains échantillons très-rares donnent une bien plus grande latitude au point de vue du choix de la température. C'est ainsi qu'en 1887 j'ai récolté de l'*Hordeum distichum* tellement propre à la fermentation butylique que je n'eus qu'à en mélanger la farine à de l'eau à 60 C° pour obtenir une fermentation absolument pure [1]). Tous les échantillons des années suivantes ne me donnèrent vers 60° C. que des fermentation acides, qui sont fatales à la bactérie butylique et l'arrêtent bientôt dans son développement. C'est pourquoi il faut dans les cas ordinaires opérer à la température d'ébullition, mortelle au moins pour les ferments lactiques.

Je n'ai pu expliquer autrement la manière particulière dont se comportent ces échantillons pour lesquels l'ébullition de la pâte est superflue, qu'en admettant qu'il s'y trouve une variété particulièrement vigoureuse de bactérie butylique [2]). J'y ai été conduit encore par les circonstances suivantes. Nous verrons que je dispose d'un procédé permettant de récolter les bactéries butyliques isolées. Je les sèche, les fragments étant alors conservés tels quels ou pulvérisés préalablement dans un mortier. C'est ce que j'ai souvent fait, sans me donner à cette occasion la moindre peine pour empêcher la dissémination de la poussière bactérienne dans l'air du laboratorie. Il s'est trouvé que cette poussière flottant dans l'atmosphère, a pu infecter en 1887 des ballons fermés suivant le dispositif de Pasteur et remplis d'extrait de malt. Ces ballons avaient été ensemencés avec d'autres bactéries et étaient par la végétation de ces bactéries purgés d'air. L'infection avec les spores butyliques avait eu lieu lors de leur ouverture. Il s'y était opéré une fermentation butylique incomplète. J'ai encore observé une infection butylique spontanée extrêmement remarquable dans une masse de gélatine, de lévulose et d'amidon, que j'employais pour des expériences sur la production d'oxygène chez les chlorelles. La gélatine, ensemencée avec des *Chlorella* et des *Mycoderma* était enfermée entre deux plaques de verre, formant ainsi une chambre entièrement mise à l'abri de l'air par un lutage à la paraffine. L'infection butylique n'a pu être reproduite plus tard, même dans des expériences instituées spécialement dans ce but. Je possède encore des bactéries butyliques sèches

---

[1]) Les bactéries butyliques sont capables de consommer des traces d'oxygène; dans l'expérience que je viens de décrire elles y sont cependant aidées par les bactéries du foin. Celles-ci se développent au début, mais ne tardent pas à disparaître.

[2]) Il ne serait pas exact d'admettre que les ferments acides auraient fait défaut sur l'échantillon. Cette supposition n'est pas seulement très-improbable, elle est écartée par les expériences décrites ci-après.

provenant de l'année 1887 (voir § 8) et j'ai en mon pouvoir de les rendre actives et de les employer à des fermentations nouvelles. Mais leur extraordinaire énergie de croissance, leur virulence, si je puis m'exprimer ainsi, a disparu, et elles ne se comportent plus que comme les ferments butyliques spontanés ordinaires [1]). Des bactéries si exceptionnellement vigoureuses paraissent appartenir aux plus rares exceptions, et je répète mon observation antérieure que si des individus pareils font défaut, le levain butylique réclame une surveillance très-minutieuse de la température pour ne pas entrer en fermentation acide. C'est seulement quand le ferment butylique, dans son état plus faible, est uniquement accompagné, sur les céréales, des *Granulobacter Polymyxa* et *Bacillus subtilis* que toute température supérieure à 60° C. suffit, lors de la préparation de la levûre, pour assurer la culture pure du ferment butylique. Je déduis de la quantité d'acide volatil, retenu pendant la durée de l'expérience dans l'eau de condensation qui se dépose sur la plaque de verre, si un levain déterminé sera propre à des expériences de fermentation ultérieure, ou s'il y a à craindre une fermentation saccharobutyrique. Moins la réaction de ce liquide est acide, plus l'on est certain d'avoir affaire à une petite quantité de ferment butyrique ou à une variété vigoureuse de la bactérie butylique. Si l'on remarque dans une semence butylique donnée, devenue impropre par fermentation acide, la présence de clostridiums butyliques en sporulation, on pourra, à condition qu'il n'y ait pas à la fois trop de spores du *Gr. saccharobutyricum*, tuer par une nouvelle ébullition de quelques secondes les bactéries acidifiantes, et régénérer ainsi à la fois le ferment butylique et la fermentation butylique normale.

L'image microscopique du levain butylique diffère d'après les variétés de ferment qui s'y rencontrent. On trouve fig. 7 la manière dont se présente une bonne fermentation dans de la farine d'orge nue. Afin de ne pas rendre la figure moins claire, on n'y a dessiné que les bactéries, laissant de côté les fragments de farine. La préparation ayant servi à faire cette figure provenait du stade auquel l'oxygène est complètement consommé. Les clostridiums y jouent le rôle principal.

Il n'en est pas ainsi toutefois aux premiers débuts de la croissance, aussi longtemps qu'il y a encore des traces d'oxygène. On ne trouve à ce stade de début que la seule forme »à oxygène« du ferment butylique, qui possède l'aspect de bâtonnets (fig. 6), et demande beaucoup d'exercice pour être distinguée des bactéries butyriques et du foin. Cependant le ferment butylique présente déjà à cette époque quelque chose de caractéristique: les bâtonnets sont en effet plus courts et bien plus distinctement arrondis aux extrémités que chez le *G. saccharobutyricum* et le *Bacillus subtilis*.

Si la fermentation butylique a lieu dans les règles, les bâtonnets du stade initial sont bien vite remplacés par des clostridiums renfermant des spores. Le stade le plus élevé, caractérisé par cette forme, se fait attendre bien plus longtemps au contraire dans la fermentation butyrique. Plus les clostridiums sont courts et épais, plus la formation d'alcool butylique est abondante. Si les spores sont absolument rondes on se trouve en présence d'une forme afaiblie du ferment butylique.

---

[1]) Je conserve les bactéries butyliques dans de petits flacons à bouchon de verre dans une chambre toujours chauffée entre 15 et 25°C. L'expérience apprend que de gros morceaux de la masse bactérienne sèche restent plus longtemps vivants que les matériaux finement pulvérisés.

§ 3. Le liquide fermentation.

Le levain en fermentation butylique est bien trop mélangé de farine pour servir à une étude chimique plus détaillée du phénomène. Si l'on se rappelle toutefois que la nutrition de la bactérie butylique est très-analogue à celle de la levûre alcoolique, on ne peut guère s'étonner que le moût provenant de la pâte de malt d'orge des fabriques de levûre [1]) fournisse un liquide extrêmement propre à la fermentation butylique. Il faut toutefois réduire le degré saccharométrique de ce liquide à 10 environ, car la fermentation est déjà nettement entravée à s⁰ 12. Si nous comparons ici la fermentation butylique avec la fermentation alcoolique, il ne faut pas oublier que cette comparaison n'est applicable qu'aux conditions chimiques de la nutrition des ferments intéressés. Il existe sous d'autres rapports très-importants des antithèses très-prononcées entre les deux organismes. J'insisterai ici spécialement sur le fait que la levûre alcoolique ne peut fermenter sans air que pendant un temps très-court, parce que la réserve d'oxygène présente dans les cellules ne suffit qu'à la production de trente générations de cellules au plus et doit être renouvelée ensuite. La bactérie butylique au contraire est presque complètement anaérobie et cesse même de croitre et de fermenter en présence d'oxygène en quantité un peu considérable.

Disons encore que l'optimum de température pour la fermentation alcoolique (des distilleries et fabriques de levûre) est d'environ 30° C.; tandis que pour la fermentation butylique il est situé à environ 37°. Les bactéries butyliques enfin sont très-sensibles aux acides, de manière que la fermentation qu'elles provoquent se trouve déjà arrêtée par 2 à 3 cm^3 d'acide normal par 100 cm^3 de liquide en fermentation. Le même liquide, additionné de 6 à 10 cm^3 d'acide lactique ou tartrique normal peut encore entrer en fermentation alcoolique et produire beaucoup de levûre [2]). Si les conditions sont donc bonnes d'ailleurs, le ferment butylique peut encore supporter tout au plus 1 à 2 cm^3 d'acide normal par 100 cm^3. Il est donc important pour la fermentation butylique de neutraliser le moût, si l'on s'aperçoit que lors de sa préparation il y avait eu une légère fermentation lactique. Or, cela arrive fréquemment dans les expériences en grand, car le moût non houblonné s'acidifie avec une facilité extrême. J'ai d'abord opéré la neutralisation à l'aide d'un excès de craie, ajouté déjà lors de l'ébullition. Mais depuis que je sais que le *Granulobacter butylicum* ne donne pas d'acide butyrique avec le maltose, et de faibles traces seulement d'autres acides, qui ne nuisent pas à la fermentation, je ne neutralise d'abord qu'à l'aide d'un peu de carbonate de sodium ou même je le néglige absolument. Tandis que, comme je viens de le dire, le *Granulobacter butylicum* ne donne pas d'acide avec le maltose, il se pourrait que cela eût lieu dans certaines circonstances avec le glucose, et à divers degrés d'intensité. Les

---

[1]) Ce brassin est sensiblement neutre et peut indiquer 20 degrés au saccharomètre. Il n'est pas employé tel quel pour l'industrie de la levûre, mais mélangé à du marc et dilué avec de la vinasse jusque s⁰ 10.

[2]) J'ai observé, dans des conditions très-favorables au point de vue de la nutrition, dans des pâtes de malt épaisses, une fermentation alcoolique normale malgré une proportion de 25 cm^3 d'acide lactique normal par 100 cm^3 de pâte! Il y avait eu en même temps deux ou trois divisions cellulaires; la chaleur de fermentation produite était normale et le rendement d'alcool également normal. Du moment toutefois que les moûts renferment peu de marc, 12 cm^3 d'acide lactique normal sont déjà très-nuisibles au développement des cellules de levûre.

variétés les plus vigoureuses de la bactérie butylique pourraient en effet fabriquer simplement de l'alcool butylique et pas d'acide; les plus délicates au contraire, outre de l'alcool, une petite quantité d'acide butyrique. Les dernières forment ainsi la transition au *Gr. saccharobutyricum*, dont on ne peut d'ailleurs les distinguer toujours avec pleine certitude à d'autres points de vue. Il faut dans ces conditions avoir recours de préférence à la neutralisation au moyen de craie.

Quant au *Granulobacter saccharobutyricum* lui-même, cette bacterie fabrique, aux dépens du glucose, outre une petite quantité d'alcool butylique, beaucoup d'acide butyrique, et même elle en donne aux dépens du maltose. L'acide produit nuit à la formation des zooglées, tandis que la production de gaz demeure très-intense. Si le liquide de fermentation renferme beaucoup de glucose, la marche normale de la fermentation change complètement du moment que le *Gr. saccharobutyricum* se trouve accompagné du *Gr. butylicum*. C'est ce que les circonstances que je viens de signaler permettent d'attendre et ce que je désire mettre une fois de plus en relief. Je me propose en conséquence de traiter simplement des liquides pauvres en glucose, tels qu'on les fabrique artificiellement dans l'opération industrielle du détrempage. Je supposerai toujours que les matériaux d'ensemencement nous soient fournis par le *Gr. butylicum* pur ou tout au moins infecté d'une manière insignifiante par le ferment butyrique.

§ 4. Culture pure du ferment butylique en gélatine nutritive. Méthode d'expérience.

Il est nécessaire, pour obtenir une culture pure du ferment butylique dans de la gélatine nutritive appropriée, d'opérer complètement à l'abri de l'air. Même la forme aérobie du ferment, que nous apprendrons à connaître plus tard de plus près, se développe à de si faibles tensions d'oxygène que les méthodes chimiques de dosage de cet élément sont insuffisantes pour en démontrer la présence [1]). Seul le procédé des bactéries lumineuses me permit de déceler encore dans les liquides dont il s'agit la présence d'oxygène, de manière que l'expérience physiologique surpasse encore ici, comme dans tant d'autres cas, en précision, et jusqu'à un certain point en simplicité, l'expérience chimique [2]).

Comme un moût de concentration moyenne fournit le milieu nutritif le mieux approprié au ferment butylique, il faudra préparer un moût gélatiné absolument exempt d'oxygène, et mettre la culture ensemencée à l'abri de l'air. J'ai essayé la

---

[1]) La présence d'oxygène dans un milieu riche en substances organiques, comme le moût, peut se déceler, surtout quand il s'agit de déterminations quantitatives, au moyen de deux procédés. C'est d'abord le procédé de M. Schützenberger au moyen d'hydrosulfite, avec l'indigosulfate de sodium comme indicateur (Schützenberger. Les fermentations, 4e édit. p. 92, 1884); c'est ensuite le procédé des bactéries lumineuses. Faut-il doser quantitativement l'oxygène dans de l'eau potable ou en général dans des liquides pauvres en substances organiqes, on se servira de préférence, à cause de leur simplicité, de la méthode iodométrique de Winkler (*Ber. d. D. chem. Ges.*, Jahrg. 21. p. 2843, 1888) ou de la méthode au permanganate modifiée par M. A. Lévy (*Ann. de l'Observ. municipal de Montsouris*, 1892—93, p. 233).

[2]) Un bon liquide phosphorescent, séparé de l'air par du mercure, réagit avec une sensibilité remarquable envers des traces d'oxygène. Il suffit que l'oeil soit rendu assez sensible à la suite d'un séjour prolongé dans l'obscurité.

plupart des méthodes, recommandées pour la confection de cultures anaerobies pures [1]), et j'ai moi-même imaginé quelques dispositifs spéciaux pour isoler le ferment butylique. Le temps réclamé par les expériences n'est pas très-différent pour les diverses méthodes. Il en est bien ainsi au contraire de la facilité avec laquelle les colonies peuvent être recueillies et employées aux recherches soit microscopiques soit d'autre nature. J'ai cru important de cultiver les colonies butyliques sur plaque de gélatine, que l'on peut examiner avec la même facilité que dans les procédés sur plaque ordinaires. On peut ainsi suivre un colonie dans sa croissance plusieurs jours de suite, et lui emprunter des matériaux de recherches. Ce but a été le plus facilement atteint de la manière suivante.

On commence par rendre complètement exempts d'oxygène, dans un petit ballon, 25 cm^3 environ de moût gélatiné. Le bouchon d'ouate est traversé par un petit tube de verre permettant, pendant le refroidissement de la gélatine, et avant l'ensemencement, d'introduire de l'acide carbonique dans le ballon. Si l'on possède, comme d'habitude, des matériaux d'ensemencement renfermant des spores, un bon levain butylique par exemple, ou une fermentation mûre, l'inoculation peut se faire vers 60° à 90° C. Les ferments lactiques, s'il y en a, et les bactéries des fermentations ordinaires [2]) sont tuées à cette température. Une fois la culture ensemencée, on la refroidit jusqu'à la température de solidification dans un courant d'acide carbonique; puis on la transvase rapidement dans un cristallisoir ou une capsule de verre, où le refroidissement doit s'opérer dans un fort courant d'acide carbonique. Il suffit à cet effet que l'on introduise le gaz sous le couvercle légèrement soulevé. La capsule aura naturellement été préalablement complètement stérilisée à une température de 125 ° C.

Du moment que la couche s'est solidifiée, on place la capsule, le couvercle en bas, dans un exsiccateur de Hempel. Celui-ci est en rapport, à l'aide d'un robinet à trois voies, avec une trompe à eau et un appareil dégageant de l'hydrogène; on fait le vide, remplit avec de l'hydrogène, fait le vide de nouveau, etc. Comme il n'est pas possible d'enlever par ce procédé les dernières traces d'oxygène, on a mis au préalable dans la gouttière circulaire de l'exsiccateur une substance quelconque absorbant cet élément. J'ai pris soit une solution concentrée de l'hydrosulfite $(SO_2 Na_2)$ de M. Schützenberger [3]), soit quelque autre corps facilement oxydable: p. ex. du pyrogallol alcalin, de l'hydroxyde de fer ou de manganèse fraîchement précipité, du sulfate de fer précipité avec du ferrocyanure de potassium. On introduit ces substances sous forme de pâte épaisse dans la gouttière de l'exsiccateur. J'ai encore employé avec succès du phosphore en cylindres. Il ne m'a toutefois pas été possible d'empêcher complètement dans ce cas la formation de vapeurs d'acide phosphorique, ce qui était nuisible au développement du ferment.

[1]) On en a recommandé un grand nombre dans ces dernières années. Il est surprenant que plusieurs auteurs décrivent le procédé, mais négligent d'indiquer les bactéries qu'ils ont réussi à isoler ou à cultiver.

[2]) C'est-à-dire les formes si nombreuses appartenant au *Bacillus lactis aërogenes* ou au *B. coli commune* d'Escherich, dont les individus se rencontrent parfois en quantité surprenante sur les céréales.

[3]) On peut se procurer ce sel chez M. Schuchardt à Görlitz. La substance est d'ailleurs facile à se préparer soi-même.

Mais la respiration de certains microbes s'est montrée encore mieux appropriée que ces divers moyens chimiques à réaliser nortre désidératum. Pour en faire usage, je procède comme suit.

Au lieu de remplir la gouttière de l'exsiccateur d'un des liquides mentionnés ci-dessus, j'y introduis du malt gélatiné mélangé de glucose et additionné d'une forte proportion de fleur de bière *(Saccharomyces Mycoderma)* en culture pure [1]). Ce champignon absorbe avec avidité les dernières traces d'oxygène, et se développe également un peu par voie anaérobie aux dépens du glucose, en produisant de l'acide carbonique et de l'alcool. Une légère quantité de gaz tâche de s'échapper de l'exsiccateur, et j'obtiens ainsi une atmosphère absolument privée d'oxgène, et restant telle dans la suite.

Des moisissures ou d'autres agents d'infection aérobies ne sont pas beaucoup à craindre dans ces expériences, car ils ne se développent pas du tout si les expériences sont bien faites. Il est cependant toujours à recommander d'empêcher ces infections, afin de pouvoir sans danger conserver les capsules dans la suite, quand les colonies sont complètement développées, sous un simple couvercle de verre, par conséquent en présence de l'oxygène.

Si l'on porte l'appareil ensemencé et privé d'air dans une étuve à 20° C., on voit, au bout de cinq à six jours (le temps varie d'après que l'ébullition a plus ou moins complètement chassé l'oxygène de la gélatine), les colonies apparaître sous forme de petites sphères mucilagineuses blanches qui ne liquéfient pas le substratum.

L'acide carbonique et l'hydrogène de fermentation, qui prennent en même temps naissance, s'accumulent jusqu'à saturation dans la couche de gélatine et y produisent, dans le voisinage des colonies, les bulles gazeuses lenticulaires bien connues.

Les colonies sont de deux sortes. Elles peuvent être formées soit de bâtonnets ou de filaments sans spores (fig. 6), soit de clostridiums et de bâtonnets renfermant de la granulose et des spores (fig. 7, 8).

La différence entre les deux formes est très-grande, mais on trouve toutes les transitions possibles, et si l'on examine de plus près les conditions de leur apparition, on voit que les clostridiums prennent naissance à l'abri absolu de l'oxygène, les bâtonnets quand il y a des traces de cet élément en présence.

Dans un extrait gélatiné convenable, et quand l'absence d'oxygène est complète, les colonies deviennent très-grandes, et donnent facilement des sphérules de 5 mm. de diamètre. On peut les retirer d'un seul coup, à l'aide du fil de platine, de leur substratum, et elles se montrent alors sous la forme de zooglées mucilagineuses, formées de clostridiums ou de bâtonnets mobiles ou en repos, renfermant ou non des spores. Les clostridiums et les bâtonnets varient d'ailleurs considérablement entre eux. Les colonies qui ne sont formées que de bâtonnets se colorent en jaune par une solution d'iode; celles formées de clostridiums se colorent en bleu violet, même en noir. Pour observer une réaction bien nette il est à recommander de laisser séjourner quelque temps les objets dans une capsule de porcelaine renfermant la solution d'iode. L'iode en effet ne pénètre que lentement dans les zooglées. On examinera les préparations sur un fond blanc.

---

[1]) La levûre alcoolique et différentes espèces de bactéries ont été également employées avec succès.

Si l'élimination de l'oxygène n'a pas été complète, mais suffisante cependant pour que la croissance fût possible, il se forme, comme je l'ai dit, des colonies simplement constituées par des bâtonnets ou des filaments, qu'il faut donc considérer comme la forme »à oxygène« du ferment butylique. Ces organismes se colorent en jaune par l'iode et donnent absolument l'impression d'une autre espèce de bactéries. Comme nous rencontrerons de nouveau la même forme plus loin, à propos de la »fermentation principale«, nous pouvons la passer provisoirement sous silence.

Je ferai remarquer que l'addition d'un peu d'empois d'amidon ou d'amidon soluble au moût gélatiné permet de démontrer directement et d'une manière extrêmement caractéristique la formation de l'amylase butylique. Autour de chaque colonie en effet prend naissance une aire de diffusion [1]), dans laquelle la diastase a détruit l'amidon, de manière que l'iode ne peut plus y faire apparaître la teinte caractéristique. Si donc on verse une solution d'iode sur une plaque de moût gélatiné renfermant des colonies du ferment butylique, les champs de diffusion de l'amylase tout autour des colonies ne se colorent pas, tandis que la gélatine amidonnée prend une teinte noir bleuâtre. Sauf les embryons de Graminées, qui occupent le premier rang au point de vue de la production de fortes quantités d'amylase, je ne connais jusqu'ici pas d'organismes qui puissent se mesurer aux colonies du ferment butylique à l'égard de l'intensité de cette excrétion. Je ne pus observer de différence sensible entre les clostridiums et la forme aérobie dans la quantité d'amylase produite.

Il va de soi qu'une culture anaérobie du ferment peut être faite encore de bien d'autres manières. Des chambres de verre tout à fait remplies par exemple sont très-simples et très-pratiques; on pourra en employer qui se composent d'un anneau de verre fermé des deux côtés par une plaque de verre poli. Il faut cependant tenir compte de la couche d'air adhérant aux plaques et prendre en conséquence un épais anneau, c'est-à-dire qu'on opérera avec une plaque de gélatine large et épaisse, mesurant par exemple 50 cm ³ sur 3 mm. d'épaisseur. Il faut aussi que les plaques de verre soient serrées au moyen de vis sur l'anneau, sinon l'air a encore accès. Ce qui rend cette disposition imparfaite, c'est que si l'on ouvre la chambre, au moment où les colonies doivent être examinées, la gélatine reste adhérer en partie au couvercle. Quand on remet celui-ci en place, des bulles d'air et le plus souvent aussi des spores de moisissures ont eu le temps de pénétrer, et l'expérience doit donc prendre fin quand la chambre humide a été une fois ouverte.

Ces désagréments s'attachent encore au procédé généralement connu et d'ailleurs excellent de Liborius [2]). On cultive d'après cette méthode en gélatine nutritive, que l'on stérilise simplement dans des éprouvettes, qu'on rend ensuite exempte d'oxygène par l'ébullition [3]), qu'on ensemence et qu'on laisse se solidifier. Dans les couches profondes du tube, où l'oxygène ne peut pénétrer, se forment les colonies, auxquelles on se fraie accès au moyen d'un trait de lime dans la paroi du tube. Les cultures butyliques, préparées par ce procédé en moût gélatiné, montrent une couche super-

---

[1]) On trouve souvent rapporté que »la diastase« n'est pas diffusible. C'est une erreur; les différentes formes d'amylase diffusent avec la même vitesse environ que les peptones, et traversent avec facilité les membranes organiques.

[2]) *Zeitschr. f. Hygiene*, Bd. I, p. 161, 1886.

[3]) Il n'est pas nécessaire de faire passer de l'hydrogène dans la gélatine. Cette opération est même à déconseiller à cause de la production d'écume.

ficielle de deux à trois centimètres d'épaisseur, dans laquelle, par suite de la présence d'oxygène, des colonies ne peuvent prendre naissance. Au-dessous de cette couche le développement est régulier. Les colonies supérieures, que l'oxygène atteint au bout d'une couple de jours en se diffusant dans la gélatine, continuent cependant de croître; si bien que même après plusieurs semaines on ne trouve aucune différence de volume entre les colonies voisines de la surface et celles situées dans les profondeurs du tube. Ces colonies sont toutefois constituées à la périphérie par la forme dite »à oxygène« (fig. 6); au centre se rencontre la forme en clostridium du ferment (fig. 8).

Si je ne puis recommander en première ligne la méthode de Liborius pour la culture pure, je ne puis cependant négliger de faire ressortir à ce propos l'importance de ce prodédé à d'autres points de vue. Voici ce que j'en dirai.

Si l'expérience a été bien faite, la longue colonne de gélatine dans l'éprouvette, que l'on vient de fermer par un tampon d'ouate, présente de haut en bas tous les degrés de saturation par l'oxygène. Un simple coup d'oeil suffit donc, avec une culture quelconque de microbes, pourvu que l'on ait distribué ceux-ci d'une manière suffisamment serrée dans la gélatine, pour reconnaître si l'on a affaire à l'anaérobiose facultative ou obligatoire. On pourra même, si la nutrition peut s'opérer dans des conditions favorables, reconnaître l'anaérobiose temporaire, généralement moins apparente, (comme p. ex. chez la levûre alcoolique) et la distinguer nettement de l'anaérobiose facultative.

La gélatine a-t-elle été additionnée d'un peu d'hydrosulfite de sodium et d'indigosulfate de sodium, ce qui donne de l'indigo blanc, on reconnaîtra à la production, de haut en bas, de bleu d'indigo, jusqu'à quel niveau l'oxygène a pénétré dans la masse. La culture du ferment butylique permettra d'observer que les premières colonies n'apparaissent que dans les régions où l'on trouve de l'indigo blanc. Il faut dans cette expérience que l'éprouvette soit conservée dans l'obscurité, sinon le bleu d'indigo s'oxyde à la lumière et se décolore. L'oxygène ne le modifie pas au contraire à l'obscurité.

Un deuxième usage remarquable et général de cette méthode, — mais qui n'est également applicable que si l'ensemencement est suffisamment dense, — consiste à reconnaître la présence de la fonction fermentative. Comme celle-ci est toujours accompagnée de la production de gaz, et que la gélatine ne laisse pas échapper le gaz formé, on voit à la présence de bulles gazeuses que la fonction fermentative existe. Le ferment butylique surtout montre de cette manière combien la production de gaz dans le moût gélatiné est intense. C'est par cette méthode que l'on peut facilement s'informer si un sucre ou un hydrate de carbone en général, est fermentescible ou non [1]).

Il y a encore un troisième point de vue auquel ce procédé peut rendre de grands services, savoir la détermination du pouvoir réducteur. On ajoute à cet effet à la gélatine une matière colorante quelconque donnant par réduction un chromogène incolore. On emploiera par exemple le tournesol ou le bleu Coupier, mais on obtiendra de beaucoup les meilleurs résultats par l'indigosulfate de sodium. Le ferment butylique développe dans ces expériences un pouvoir réducteur tout particulièrement intense.

On voit donc que le procédé de Liborius présente maints avantages, sinon pour la culture pure, au moins sous d'autres rapports importants.

---

[1]) C'est ainsi que je trouvai que la glycérine, la mannite, le saccharose et la dextrine sont fermentescibles, avec production d'alcool butylique, d'hydrogène et d'acide carbonique.

Mais revenons aux colonies du ferment butylique, obtenues par culture pure.

J'ai infecté au moyen de celles-ci une série de mes ballons, et obtenu de cette manière les fermentations les plus belles et les plus productives, sans trace d'acide butyrique. Les phénomènes qui s'observèrent à ce propos montrèrent que »l'état« des colonies a incontestablement une certaine influence sur les métamorphoses des bactéries pendant la fermentation, ainsi que sur la nature des produits formés. J'entends par »l'état« la ressemblance plus ou moins grande des colonies à la forme soit »à oxygène« soit clostridique. Si l'on part de la première dans l'inoculation, cette forme se maintient extrêmement longtemps dans le cours de la fermentation principale, et le rendement en alcool butylique devient simultanément plus faible. C'est précisément l'inverse qui s'observe avec le clostridium. Le caractère de clostridium est un caractère en même temps morphologique et physiologique, provoqué par les circonstances extérieures, et consistant en une accumulation de réserve d'oxygène. Ce caractère possède un certain degré d'hérédité.

Le résultat principal de l'étude des cultures pures a d'ailleurs été la pleine conviction que j'ai obtenue de pouvoir réaliser avec mes levains butyliques d'orge nue ce que donnent les ensemencements à l'aide des colonies butyliques. Les manipulations de cultures pures m'ont fourni de plus une série d'autres bactéries remarquables, capables de vivre dans les liquides de fermentation butylique et soit indifférentes soit nuisibles pour les organismes de cette fermentation. Sauf les »bacilles du foin«, tous ces organismes peuvent, par l'application d'une haute température, être séparés de la bactérie butylique, car ils ne produisent pas de spores, ou des spores qui succombent déjà à 90°—95° C.

Je signalerai encore que si les cultures pures et leur usage ne m'ont à vrai dire appris rien de nouveau au sujet de la fermentation, seules elles ont développé en moi ce sentiment de satisfaction scientifique, nécessaire pour que l'on puisse considérer une étude comme terminée. Il y a d'ailleurs un point qui, sans les cultures pures, serait resteé pour mes lecteurs sujet au doute, c'est le fait que la forme »à oxygène« appartient bien réellement au ferment butylique. Une seule culture sur gélatine, opérée avec succès, montre de la manière, la plus complète, par un simple examen microscopique, les relations qui existent entre les colonies à clostridiums et les colonies de bâtonnets ou de filaments. Si je n'avais pas étudié d'une manière complète et souvent employé les cultures pures, je n'aurais pas été personnellement moins convaincu de leur parenté réciproque, mais je me serais peut-être alors heurté à des contradictions, à présent exclues.

§ 5. Le ballon à fermentation butylique et la fermentation principale.

Il faut en premier lieu que le ballon soit disposé de manière que l'air puisse être complètement évacué et que l'infection s'opère en conséquence à l'abri complet de l'oxygène. Le gaz formé doit pouvoir se récolter sans peine, et le contenu être constamment soumis à l'examen microscopique, toujours sans que l'air ait accès.

Pour atteindre ce but assez compliqué, j'ai fait souffler plusieurs modèles de ballon; mais finalement je me suis arrêté à un dispositif très simple, que je puis spécialement recommander aux chimistes et physiologistes qui aurient l'intention de répéter mes expériences.

S'il s'agit, comme dans le cas présent, d'anaérobiose presque complète, il est désirable de ne pas opérer sur de trop petites quantités des liquides en fermentation. Tous les organismes anaérobies des sucres qui me sont connus ont il est vrai le pouvoir de consommer par leur propre activité vitale les dernières traces d'oxygène [1]); mais les expériences donnent les meilleurs résultats quand on limite autant que possible ce minimum inévitable. J'opère en conséquence avec des ballons d'une contenance d'un litre à col très-étroit et allongé. La fermentation butylique ici décrite peut parfaitement être étudiée indépendamment de la méthode à la gélatine, et les chimistes aussi la répéteront donc sans difficulté. J'ai cru en conséquence désirable de décrire non seulement le ballon à employer, mais de figurer la disposition entière servant à la fermentation butylique. C'est ce qu'on trouvera fig. 3.

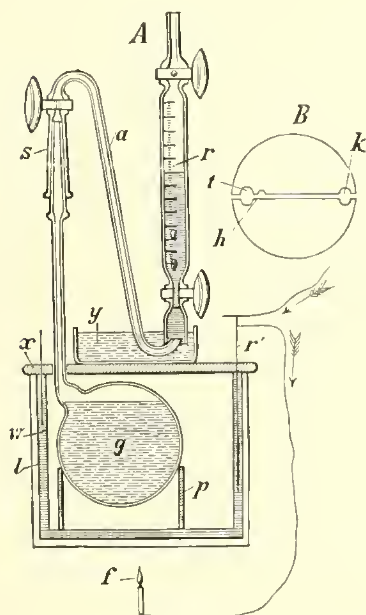


Fig. 3. Disposition des appareils pour la fermentation principale.

A Ballon de fermentation dans le thermostat.
- *g* Liquide en fermentation.
- *p* anneau de carton.
- *h* col du ballon.
- *a* tube abducteur des gaz.
- *y* cuvette a eau.
- *r* récipient à gaz.
- *s* col rodé.
- *t* thermomètre.
- *f* bec.
- *w* cuvette d'eau du thermostat.
- *c* enveloppe d'air.
- *x* couvercle de bois.
- *r'* thermorégulateur.

B Le couvercle de bois, divisé en deux moitiés.
- *k* orifice pour le thermorégulateur.
- *t* orifice pour le thermomètre.
- *h* orifice pour le col du ballon.

On voit, dans cette figure, le ballon (*g*), placé dans un thermostat peu compliqué, composé d'un manchon à eau en cuivre rouge (*w*), enveloppé à son tour d'un manchon à air en fer blanc (*l*). Il y a de plus autour de tout l'ensemble un deuxième manchon à air, mais mobile et non représenté dans la figure. J'ai employé comme couvercle une plaque de bois (*x*) formée de deux moitiés, et disposée de telle manière (fig. 3 *B*) que les bouchons servant à fixer en place le thermorégulateur (*r'*) et le thermomètre (*t*), ainsi que le col du ballon de fermentation, soient maintenus dans des ouvertures semicirculaires [2]).

Le ballon (*g*) repose dans le thermostat sur un anneau de carton (*p*). Le col s'ouvre latéralement dans le ballon, ou présente pour parler plus exactement, une

---

[1]) L'anaérobiose absolue semble seulement se trouver chez quelques ferments des matières albuminoïdes.

[2]) Le thermostat ici figuré provient de feu A. Fitz. Tous les appareils de son laboratoire privé à Strasbourg et sa belle collection de sels cristallisés d'acides organiques, sont passés, à sa mort en 1885, à la fabrique néerlandaise de levûre à Delft.

ouverture qui lui permet de déboucher à l'extérieur vers la périphérie du thermostat. Le convercle de bois reste ainsi entièrement libre et peut servir à recevoir la cuvette à eau (*y*) et le support de la burette à gaz (*r*).

Le tube abducteur du gaz (*a*), est rodé à son embouchure et s'adapte au col du ballon. Il peut être fermé au moyen d'un robinet de verre [1]). Il y a, lors de la fermentation butylique, à cause de la formation de zooglée, passage constant d'un mucilage bactérien, entraîné par les gaz, dans la cuvette d'eau (*y*). On se trouve donc en mesure de recueillir toujours, à l'aide du porte-objets, des matériaux pour l'examen microscopique. Il suffit pour cela de séparer le tube abducteur du col rodé du ballon de fermentation. Mais il est souvent désirable d'examiner de temps en temps le liquide lui même, soit par voie chimique, soit au microscope. On voit que le dispositif employé facilite beaucoup un examen de cette nature. Il suffit à cet effet d'incliner légèrement le ballon. Le liquide ferme l'accès du col, et le gaz est obligé de s'accumuler dans l'espace qui surmonte le moût en fermentation. Au lieu de la zooglée et de gaz, c'est le liquide lui-même qui se trouve en ce moment refoulé. On peut alors, soit en mouiller une lame porte-objet à l'embouchure même du col, soit le laisser entrer dans le tube abducteur et le récolter en telle quantité que l'on jugera désirable. Si l'on veut alors de nouveau récolter les gaz de fermentation, on n'aura qu'à replacer le ballon dans sa position primitive. Il ne sera pas inutile de faire remarquer que la forme du col, telle qu'elle a été choisie, permet de tourner le tube abducteur dans toutes les directions, sans que celui-ci cesse de se trouver à la même distance verticale du couvercle. On remarquera en manipulant l'appareil combien cette disposition est commode pour la récolte du gaz.

Le récipient (*r*) se compose de trois parties, séparées par deux robinets, savoir d'une cloche pour la récolte du gaz, d'un réservoir calibré et du tube abducteur permettant de conduire le gaz dans la burette d'analyse. Le tube abducteur doit être, il est vrai, étroit pour se laisser recouvrir sans peine d'un tube de caoutchouc, mais cependant suffisamment large pour qu'on puisse facilement le remplir d'eau, au moyen d'une pisette, sans rencontrer de résistance capillaire. D'autres details de moindre importance se déduiront de la figure.

Le remplissage du ballon au moyen d'un liquide de fermentation absolument privé d'air réclame une attention toute spéciale. La fig. 4 montre comment on s'y prendra du préférence.

Deux bains de sable (*s*, *s'*) sont placés l'un à côté de l'autre. Ils supportent respectivement le ballon de fermentation (*g*) et un ballon à ébullition ordinaire (*k*), maintenus l'un et l'autre en ébullition vive au moyen de becs de Bunsen (*f*, *f'*). Un tube de verre (*a*), réuni au ballon de fermentation au moyen d'un tube de caoutchouc (*r*), permet le passage de l'écume dans le ballon (*k*). Si toutefois celui-ci se remplit trop, on soulève un instant le ballon de fermentation au-dessus du bain de sable, et l'on refroidit en soufflant dessus l'espace qui surmonte le liquide. La vapeur d'eau se condense; le liquide bouillant passe instantanément de *k* dans *g*, et remplit de nouveau

[1]) J'ai fait construire également des ballons soudés en une seule pièce au tube abducteur; mais j'ai trouvé cette disposition fautive. Il est également peu pratique, comme je l'ai essayé, de placer le robinet sur le trajet du col du ballon, et non sur celui du tube abducteur. J'ai employé encore plusieurs systèmes de robinets à trois voies, mais je ne puis cependant en recommander l'usage.

ce ballon. Du moment que l'on considère l'oxygène comme complètement éliminé, on délivre le tube *(r)* du tube de caoutchouc; on ferme celui-ci au moyen d'un fragment de baguette de verre, tandis que l'ébullition est encore vive et qu'un jet de vapeur sort du ballon. Celui-ci est alors enlevé du bain de sable et mis à refroidir. Il est évident qu'un vide se forme en même temps que le tube de caoutchouc se contracte complètement et se bouche. Cette fermeture est tellement hermétique que dans un ballon préparé en juillet le vide s'est encore trouvé conservé en octobre, et que j'ai pu y développer la fermentation butylique.

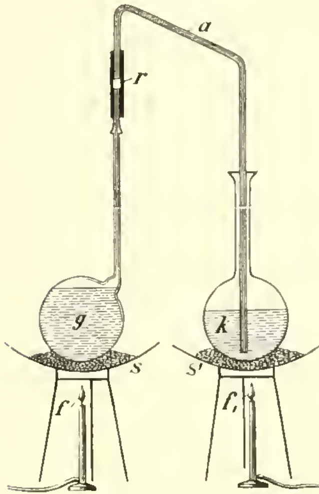


Fig. 4. Remplissage du ballon à l'abri de l'air.

g Ballon de fermentation.
r tube de caoutchouc.
a tube de communication.
k ballon d'ébullition.
s s' Bains de sable.
f f' becs.

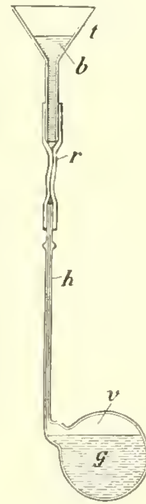


Fig. 5. Infection du ballon à l'abri de l'air.

g Liquide de fermentation.
v Vide.
h Col.
r Tube de caoutchouc.
t Entonnoir de verre.
b Levain butylique.

L'infection au moyen du levain butylique ou de bactéries butyliques desséchées ou de colonies des mêmes organismes doit encore avoir lieu avec quelque prudence. On trouve fig. 3 la manière dont on opérera avec le plus de succès.

Après qu'on aura éliminé l'oxygène de la solution et refroidi celle-ci à la température de fermentation, on maintiendra fermé avec les doigts le tube de caoutchouc (*r*), d'ailleurs déjà comprimé par la pression atmosphérique; on enlève alors le bout de baguette de verre et l'on glisse à la place un entonnoir stérilisé (*t*) dans l'extrémité supérieure du tube. Si l'on se propose d'ensemencer à l'aide de levain butylique, on versera celui-ci dans l'entonnoir de manière que l'air puisse s'échapper par la partie supérieure du tube de caoutchouc. On diminue alors, à l'aide des doigts, la pression de telle manière qu'un peu du levain puisse pénétrer de l'entonnoir dans le ballon; puis on ferme de nouveau complètement par une pression nouvelle l'accès de l'air, on éloigne l'entonnoir et l'on enfonce le bouchon de verre dans la partie supérieure du tube de caoutchouc. Si l'on veut ensemencer au moyen de bactéries sèches, de colonies

bacteriennes, ou d'autres materiaux quelconques, on remplit l'entonnoir d'un peu d'eau stérilisée et bouillie, tenant en suspension la matière destinée à l'ensemencement, et l'on opère d'ailleurs comme ci-dessus. On porte le ballon dans le thermostat, et quand la production d'écume et de gaz deviennent si intenses que le bouchon de verre est presque expulsé, on enlève vitement le tube de caoutchouc et l'on adapte le tube abducteur au col rodé du ballon. Si la quantité de substance d'ensemencement n'a pas été trop faible, la fermentation commence tout de suite, et au bout de six à huit heures il règne dans le ballon une pression assez forte pour qu'on puisse y adapter le tube abducteur sans devoir craindre l'accès de l'air.

§ 6. Marche de la fermentation butylique. Forme et motilité du ferment butylique.

Je supposerai que la fermentation se passe dans un liquide de la nature décrite ci-dessus, à réaction presque neutre; peut-être très-légèrement acide, présentant une densité en extrait d'environ 10 degrés saccharométriques, renfermant tout au plus 1 à 3% de glucose, et riche en maltose, en maltodextrine et en peptones du malt. La température de fermentation est de 30 à 35° C.; le processus s'affaiblit vers 40° C.; peut-être 38° C. représente-t-il un optimum pour la vitesse de la production d'hydrogène et d'acide carbonique.

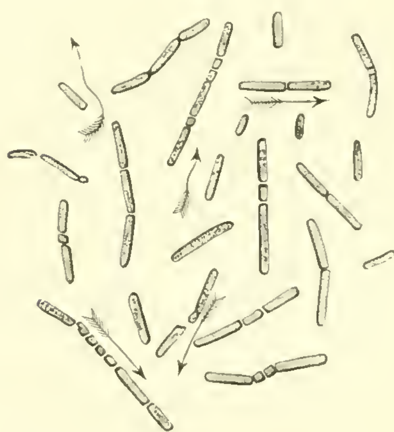


Fig. 6. (Zeiss, F. 2. Gross. 700.) Forme à oxygène du *Granulobacter butylicum*. Les mouvements sont indiqués par des flèches.

L'élimination absolue de l'oxygène des ballons de fermentation ne pourra sans doute jamais s'opérer par l'ébullition, et devra se faire par l'activité même des bactéries. Nous avons vu d'ailleurs que la fermentation peut commencer malgré qu'il y a encore des traces d'oxygène en présence. Mais il est très-remarcable, comme il a été dit au § 5, que la forme des bactéries est déterminée par ces circonstances, de sorte que l'on distinguera une »forme à oxygène« et une »forme anaérobie« du ferment butylique. Nous pourrons appeler cette dernière, vu ses caractères morphologiques, la forme clostridienne.

Si le développement de la forme à oxygène s'est fait sous l'influence d'une quantité très-petite de cet élément, elle n'est représentée que par des bâtonnets à motilité vive, très-semblables au *Bacillus subtilis*, mais en différant par ce que les individus constituant les chaines de bactéries sont très-courts (fig. 6), et par la présence de »granulations« particulières dans l'intérieur des bâtonnets. On trouve d'ordinaire tous les bâtonnets en train de se mouvoir vivement, mais les mouvements peuvent sans cause bien tranchée s'arrêter chez quelques-uns des individus ou bien chez tous. L'étude de la motilité des bâtonnets qui sont restés longtemps mobiles, sous le couvre-objet, en présence de l'air, montre que les mouvements cessent quand l'oxygène fait absolument défaut, dans une atmosphère d'hydrogène par exemple, mais reprennent quand l'oxy-

gène a de nouveau libre accès, et peuvent même continuer pendant quelque temps quand la pression est devenue égale à celle de l'atmosphère. Mais dans cette dernière circonstance il perdent bientôt totalement leur motilité.

On peut observer dans ces mêmes préparations que les bâtonnets mobiles ne peuvent supporter qu'une tension d'oxygène très-basse et qu'ils se rassemblent après quelque temps au milieu du champ formé par le couvre-objet. J'ai appelé à une autre occasion [1]) cette »figure de respiration« le »type anaérobie«, contrastant avec les »type aréobie« et »type spirille«, découverts par M. Engelmann [2]).

Si pendant leur développement les bâtonnets ont été soumis au maximum de tension d'oxygène encore compatible avec leur croissance, tous demeurent absolument en repos. Ce sont surtout les colonies en culture pure sur gélatine, sur un milieu qui retient si facilement un peu d'oxygène, qui se montrent composées de cet état immobile. Souvent il y apparaît de longs filaments absolument différents des bâtonnets butyliques ordinaires. Je déduis de cette dernière circonstance que la motilité, montrée en présence d'oxygène par des préparations fraiches provenant d'un liquide en voie de fermentation, n'est qu'un phénomène passager, malgré qu'il puisse se prolonger pendant des heures.

Les clostridiums qui prennent naissance à l'abri complet d'oxygène peuvent, à l'inverse de la forme aérobie, se trouver en mouvement assez vif, aussi bien au centre du liquide de fermentation qu'en présence d'oxygène, comme des bactéries aérobies ordinaires. Les mouvements que l'on observe en l'absence d'oxygène sont d'une nature particulière et se distinguent de la motilité en présence de ce gaz par ce que les bactéries ne montrent que peu de tendance à changer de place, et ne nagent en divers sens et n'oscillent que dans un espace restreint.

J'opère, pour faire une observation absolument correcte, de la manière suivante.

Quand je suis en possession d'une liqueur en fermentation bien vigoureuse, d'où s'échappe une zooglée riche, j'éloigne le tube abducteur et je glisse à la place un tube de caoutchouc sur le col du ballon. L'autre bout du tube s'adapte à une chambre de verre de Geissler rétrécie en son centre en un espace capillaire et reposant sur la table du microscope [3]). La zooglée doit alors traverser la chambre et s'écouler par l'autre extrémité où l'on a adapté un autre tube de caoutchouc. Ces deux tubes sont fermés par des pinces, qui, quand elles sont fermées, maintiennent la zooglée en repos et en permettent l'examen au microscope.

On peut admettre, je pense, avec pleine certitude qu'une telle disposition permet de chasser de la chambre de verre même les dernières traces d'oxygène. Cela durera sans doute un certain temps, à cause de la forme particulière même de la chambre, où le courant périphérique ne peut entrainer que lentement le liquide retenu dans l'espace capillaire central. Mais il ne semble pas douteux que finalement les dernières traces d'oxygène devront être entraînées. Le mouvement des bactéries peut donc être provoqué non-seulement par l'oxygène libre, mais encore par une réserve d'oxygène solide fixée dans le protoplasme, et demeurant inaltérée même dans un milieu privé de ce gaz.

---

[1]) *Centralblatt f. Bacteriologie*, Bd. 14, pag. 841, 1893.

[2]) *Botan. Zeitung* 1881, pag. 441; 1882, pag. 338 et 1888, pag. 606.

[3]) C'est donc presque la même disposition employée par M. Pasteur dans ses »Etudes sur la bière« p. 288, 1876. On peut se procurer l'appareil chez M. Alvergniat, Paris, 10 Rue Sorbonne. Catalogue 1887, No. 185, p. 59.

Le résultat principal fourni par cette expérience, c'est donc la démonstration du fait que même en l'absence complète d'oxygène, le mouvement de la substance vivante reste possible. Toutes les théories qui rapportent les mouvements protoplasmiques en général à l'affinité pour l'oxygène[1]) sont donc par là-même réfutées.

Les »figures de respiration« dites »anaérobies« sous couvre-objet peuvent être observées aussi et très-facilement avec les clostridiums, sans les moindres précautions particulières.

Quelle peut être la signification biologique de ces mouvements; quelle est leur utilité pour l'organisme anaérobie? Il nous faudra, pour résoudre ces questions, songer je crois non seulement à »l'aérotaxie« de M. Engelmann mais encore aux déplacements chimiotactiques découverts par M. Pfeffer[2]), et nous représenter que les clostridiums répondent par des mouvements à l'excitation provoquée par de légères variations de concentration de leur milieu nutritif, aussi bien dans la tension de l'oxygène que dans la concentration des aliments organiques et des phosphates, et recherchent, au milieu de ce mélange complexe de circonstances, celles qui leur sont le plus favorables.

Pourtant les recherches à faire dans cette direction avec les microbes anaérobies sont très-subtiles et à peine ébauchées. D'autres bactéries, plus faciles à manipuler, et particulièrement l'espèce que j'ai appelée *Bacillus perlibratus* (l. c.), nous donneront probablement dans la suite des indications précises.

La forme à oxygène du ferment butylique se rencontre également bien dans les liqueurs infectées au moyen du ferment et dans les cultures sur gélatine. Les moûts mis en fermentation par l'addition d'un levain butylique brut, généralement mélangé de *Bacillus subtilis*, peuvent renfermer dans les premiers stades cette bactérie, aérobie il est vrai, mais qui ne réclame pas beaucoup d'oxygène. Il importe d'appeler l'attention sur ce fait parce que la forme à oxygène du ferment butylique ressemble, comme nous l'avons vu, beaucoup au *Bacillus subtilis*, de manière qu'il ne parait pas impossible de les confondre. On emploiera donc de préférence des cultures pures pour étudier la forme à oxygène. On conçoit d'ailleurs sans peine que des espèces aérobies, telles que le *Bacillus subtilis, ne* pourront se développer longtemps dans les liqueurs dont la fermentation devient de plus en plus intense. Mes nombreuses cultures sur gélatine, provenant de liqueurs de cette nature, ont montré à l'évidence que si même elle est présente à l'origine, l'espèce citée ne tarde pas à disparaitre complètement, si complètement même que je dois admettre qu'elle a péri. Même le *Gr. Polymyxa*, cette espèce précédemment citée comme un hôte passablement constant des levains butyliques, et temporairement anaérobie comme la levûre de bière quoique à un degré moindre, — même cet organisme disparait rapidement des fermentations butyliques proprement dites. L'examen bactériologique montre que cette auto-purification du liquide en voie de fermentation est à peu près terminée, pour ce qui regarde les deux organismes mentionnés, au moment où la forme à oxygène en bâtonnet du ferment butylique est remplacée plus ou moins complètement par les clostridiums. A partir de ce moment, et malgré la grande diversité de forme des individus pris isolément, l'examen au micros-

---

[1]) M. Verworn, Die Bewegung der lebenden Substanz. Jena 1892.

[2]) Die chemotactischen Bewegungen von Bacterien, Flagellaten und Volvocinëen, *Tübinger Unters.* XI. p. 582. 1888.

cope, pour un observateur exercé, démontre qu'ordinairement il y a entre les deux types de notre ferment une ressemblance incontestable. Peu à peu le liquide se remplit de plus en plus jusqu'à ce que la masse entière se transforme en un mucilage cohérent comme une zooglée résistante, passant jusqu'à la fin de la fermentation par le col du ballon en même temps que les gaz formés. L'image microscopique des diverses formes appartient aux sujets d'étude les plus remarquables que la physiologie de la fermentation puisse nous offrir.

Examinons encore d'un peu plus près les métamorphoses de la forme »à oxygène« en la forme clostridienne, telle que l'examen microscopique nous permet de l'observer.

La forme »à oxygène« du ferment butyrique ne produit pas de couche proprement dite. Elle apparaît à la surface du liquide en fermentation sous forme d'une mousse

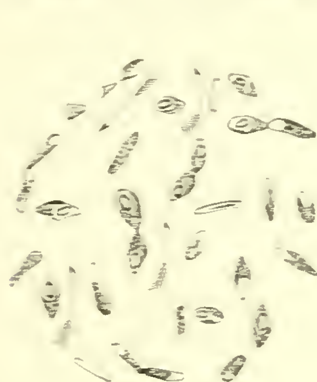


Fig. 7. Zeiss. F 2. Chambre claire. Grösse 700. Granulobacter butylicum. Forme clostridienne d'un levain butylique. Les fragments de [illegible] ont été négligés. La granulose est ombrée, les spores nettement contournées. Le mouvement est indiqué par des flèches.



Fig. 8. Zeiss. F 2. Chambre claire. Grösse 1000. Granulobacter butylicum. Forme clostridienne d'une fermentation principale. La granulose ombrée, les spores nettement contournées. Le mouvement indiqué par des flèches.

légère. Les bulles gazeuses qui prennent naissance renferment dès l'abord de l'hydrogène et de l'acide carbonique. Aussi longtemps qu'il y a encore de l'oxygène en présence il ne se forme pas d'alcool butylique.

La deuxième phase de la fermentation est caractérisée par le développement énorme des bactéries, qui correspond à la disparition complète de l'oxygène en présence et à l'apparition de la fonction réductrice. La forme des bactéries, à partir de ce moment, change rapidement. Des clostridiums renfermant de la granulose isolés ou réunis en chapelet apparaissent de toutes parts et remplissent bientôt le liquide tout entier, si bien qu'une goutte d'une solution d'iode dans l'iodure de potassium colore en bleu noirâtre une préparation prise dans le col du ballon. C'est précisément à cette phase de la fermentation que l'image microscopique des organismes est bien particulièrement intéressante. (Chaque expérience nouvelle montre des faits nouveaux), je ne puis donc figurer qu'un couple de cas déterminés tel que celui présenté par les fig. 7 et 8. Les diverses fermentations sont très-différentes au point de vue de la motilité des clostridiums, de leur longueur et de leur épaisseur, ainsi que de leur teneur

en granulose. Elles varient encore davantage au point de vue de la présence ou de l'absence de spores, et quant à la forme et aux dimensions de ces dernières. Parfois tout est en train de se mouvoir avec vivacité; parfois au contraire il règne un repos absolu, et cet état se prolonge pendant douze heures et plus, tandis que la zooglée épaisse s'écoule sans interruption par le col du ballon et le tube abducteur. La richesse en formes de ces liqueurs est telle, qu'à peine deux bactéries se ressemblent complètement. Il serait donc superflu de donner des détails, et je me contente, comme je l'ai dit, de renvoyer aux fig. 7 et 8, en guise d'exemples. La fig. 7 représente, il est vrai, un levain butylique typique (les fragments de farine étant toutefois laissés de côté), mais des combinaisons pareilles se rencontrent sans peine dans les »fermentations principales.«

L'organisation interne du ferment butylique est très-caractéristique, et je crois qu'on peut distinguer dans le corps de la bactérie différents organes. C'est ainsi que la granulose s'accumule dans une certaine partie déterminée du corps, à la vérité d'une forme très-variable [1]). La spore apparait également dans une région spéciale et est entourée d'un espace aréolaire, comme on le voit aussi dans les figures de de Bary du *G. saccharobutyricum* [2]) et dans les miennes. Au centre se trouve un espace, que je considère comme une vacuole parce que le contenu en est si mou que des parcelles qui s'y rencontrent accidentellement sont mobiles. Cet espace n'est visible qu'avec l'emploi de l'immersion homogène, et encore dans quelques cas bien favorables seulement et chez un petit nombre de bactéries vivantes. Il devient particulièrement évident quand l'organe à granulose y fait saillie sous forme d'un appendice allongé. Quand cela arrive, ce prolongement exécute dans l'intérieur de l'espace des mouvements passifs, quand le clostridium se déplace ou se recourbe. Ceci fournit une démonstration évidente que le centre de la bactérie est de consistance très-molle, peut-être même liquide; sinon un corps si délicat comme le prolongement protoplasmique de l'organe à granulose ne pourrait pas absolument y présenter de phénomènes d'inertie.

Les spores du ferment butylique appartiennent aux spores bactériennes les plus volumineuses connues jusqu'à présent. Elles mesurent très-souvent jusque 2 μ de longueur sur 1 μ d'épaisseur. Elles sont de forme elliptique ou cylindrique, à extrémités arrondies. Leurs dimensions permettent de les reconnaître même au milieu de spores de la bactérie du foin. Elles liquéfient leurs parois à la germination ou les transforment en mucilage, comme on peut l'observer sous le couvre-objet paraffiné dans une goutte de moût. Une rupture violente de la paroi n'a certainement pas lieu, et ce fait les distingue de spores du *Bacillus subtilis*, dont la germination est si bien connue par les recherches de de Bary et de M. Brefeld.

Le protoplasme hyalin des clostridiums butyliques renferme des granules ou microsomes; je n'ai pu y observer de noyau cellulaire.

§ 7. Présence d'oxygène combiné dans les moûts en fermentation. Phénomènes qui terminent le processus.

Jamais je n'ai observé de culture butylique (et jamais non plus de colonie sur gélatine), qui ne présentât pas de bâtonnets et fût exclusivement composée de clostri-

[1]) La même chose a lieu pour »l'organe glycogénique« du *Saccharomyces* ainsi que pour les »amyloplastes« des Algues vertes inférieures, telles que le genre *Chlorella*.

[2]) Voir pag. 8 Note 1.

diums. Quelle que puisse être la cause de la naissance de cette dernière forme, cette cause ne peut agir uniformément sur toutes les bactéries renfermées dans une liqueur en fermentation. Cette liqueur elle-même ne présente pas dans sa masse de différences capables d'expliquer une manière d'être si remarquable, et il faut donc en chercher la raison dans des circonstances d'origine interne. Il est certain que ces circonstances sont de nature passagère et peuvent être amenées à se renverser. On peut se convaincre en effet que les bâtonnets et les clostridiums, transportés sur gélatine, peuvent donner des cultures identiques à la semence même, ou tout au contraire les bâtonnets peuvent produire des clostridiums, les clostridiums des bâtonnets. Mêmes les spores se transforment à la germination, suivant les circonstances, soit en bâtonnets soit en clostridiums. Je ne puis m'empêcher de croire que cette différence de forme dépend ou bien de la possibilité d'un processus de réduction ou bien de l'absorption directe de l'oxygène dissous et de son accumulation dans les bâtonnets. Cette conclusion est précisément amenée par l'existence de la forme »à oxygène« et de la forme clostridienne du ferment.

Une liqueur qui montre une telle fécondité dans la production de substance vivante, et dans laquelle les phénomènes morphologiques des bactéries rendent probable une certaine action de l'oxygène, peut-elle être néanmoins regardée comme absolument exempte d'oxygène dissous? Je me suis souvent posé cette question et j'ai essayé de diverses manières d'arriver à une conclusion certaine. La chose est du plus haut intérêt théorique, car il ne 'sagit de rien moins que de la démonstration du fait s'il y a une anaérobiose continue, infinie, ou si encore dans ce cas, de même que chez la levûre de bière, elle n'est que passagère [1]).

Il faut répondre comme suit. La levûre de bière ne peut donner, en l'absence d'oxygène libre, mais dans les circonstances d'alimentation les plus favorables d'ailleurs, que quelques divisions cellulaires (vingt à trente) et cesse alors de se développer et de fermenter. Elle finit par périr en même temps que ses cellules se rompent. Il en est tout autrement chez le ferment butylique. La même liqueur fermentescible, dans laquelle la levûre de bière se développerait et fermenterait abondamment en présence d'oxygène, mais périrait sans cet élément, permet un développement et une fermentation indéfinis du ferment butylique, alors même que l'oxygène fait absolument défaut. J'ai mis en action sept fermentations successives, à l'abri le plus complet possible d'oxygène, en me servant pour l'inoculation de matériaux empruntés chaque fois à l'expérience précédente, et la septième fermentation ne présentait pas trace de diminution d'intensité ni aucune particularité saillante. Ceci veut donc dire que plusieurs millions de divisions cellulaires peuvent se succéder sans interruption, à l'abri complet de l'oxygène.

La fermentation butylique n'est pas contrariée par l'indigosulfate neutre de sodium. L'addition de ce sel, avant l'ébullition, au liquide de fermentation, donne une solution

---

[1]) Je dois observer ici qu'il y a deux classes d'anaérobies obligatoires. La première classe est représentée par le ferment butylique, qui absorbe lui-même les dernières traces d'oxygène dissous. La seconde classe comprend par exemple quelques ferments de putréfaction des peptones et le ferment de la réduction des sulfates; c'est seulement quand on emploie les moyens les plus puissants d'élimination de l'oxygène que leur culture réussit. Il est bien entendu que je ne m'occupe dans ces pages que de la première de ces deux classes.

colorée en bleu foncé. Or nous savons que les bactéries butyliques possèdent un pouvoir réducteur intense et l'on voit en effet, aussitôt que la fermentatoin s'établit, l'indigo bleu se transformer en indigo blanc. Je considère ce phénomène comme un indice certain qu'il ne peut plus y avoir d'oxygène libre en présence, et cependant c'est à partir de ce moment que la fermentation acquiert toute son intensité.

On objectera, il est vrai, que les bactéries doivent avoir consommé auparavant la très-faible quantité d'oxygène disponible, et peuvent vivre longtemps peut-être à ses dépens. Voici comment j'écarte cette objection.

Le réactif de Schützenberger, l'hydrosulfite de sodium ($SO_2\ Na_2$) est un puissant agent réducteur, qui possède la propriété de ne pas agir comme toxique à l'égard du ferment butylique et de ne pas se décomposer à l'ébullition. J'ai donc ajouté à ma liqueur de fermentation de l'indigosulfate de sodium, et de l'hydrosulfite en quantité suffisante pour réduire complètement le bleu d'indigo à l'état d'indigo blanc. Un léger excès d'hydrosulfite empêche la solution de se bleuir par l'agitation au contact de l'air. Ce liquide plus que réduit s'est cependant montré très-propre à la fermentation butylique, et je crois donc démontré que le ferment en question est capable de se développer indéfiniment en l'absence d'oxygène dissous[1]).

Je ne veux pas abandonner cette question sans avoir examiné d'un peu plus près comment se comporte »l'oxygène combiné«.

Toutes les fermentations vigoureuses où prend naissance de l'alcool butylique ont été obtenues à l'aide de moût de malt d'orge. Or nous savons depuis M. Pasteur[2]) que le moût ne dissout pas seulement physiquement une quantité considérable d'oxygène, mais la retient en partie chimiquement combinée, de telle sorte qu'on ne peut l'éloigner par l'ébullition. Cependant d'après M. Pasteur la levûre aurait le pouvoir d'employer cet oxygène combiné. S'il en est réellement ainsi, le ferment butylique sera d'autant plus apte à exercer cette fonction qu'il réduit si énergiquement certaines substances du milieu fermentescible, à l'égard desquelles la levûre est entièrement inactive, par exemple les nitrates[3]). Je ne suis pas, quant à moi, persuadé que la levûre pourraît, comme le pense M. Pasteur, employer l'oxygène combiné à entretenir ses combustions vitales, mais je crois la conclusion de M. Pasteur absolument fondée pour ce qui concerne le ferment butylique. Cet organisme peut, à mon avis, grâce à son pouvoir réducteur, atteindre ce que d'autres organismes doivent à leur

---

[1]) J'examinerai à une autre occasion comment se comporte la levûre alcoolique à l'égard d'un pareil milieu réduit (voir aussi § 12).

[2]) Etudes sur la bière, p. 357. Paris 1876. Un litre de moût de bière dissout d'après Pasteur 7 cm³ d'oxygène libre et en combine chimiquement 41 cm³, c'est-à-dire à peu près six fois autant.

[3]) L'exposé des expériences de M. Pasteur (l. c. p. 364) m'a fait songer aux difficultés suivantes. L'hydrosulfite de sodium sert à titrer l'oxygène dissous; l'indigosulfate de sodium sert d'indicateur, et est lui-même réduit à l'état d'indigo blanc par l'hydrosulfite. La levûre toutefois ne se comporte pas comme réducteur à l'égard de l'indigosulfate de sodium. Elle pourrait cependant, d'après M. Pasteur, consommer l'oxygène combiné du moût, donc réduire un corps déterminé quoique inconnu du liquide. L'hydrosulfite de sodium au contraire, qui agit à l'égard de l'indigo comme un réducteur si énergique, ne pourrait emprunter au moût que l'oxygène dissous. Ceci me semble être une contradiction, que l'on fera disparaître en refusant à la levûre le pouvoir de consommer l'oxygène tenu en combinaison dans le moût.

respiration aérienne, c'est-à-dire l'entretien de leur énergie vitale. C'est un fait acquis que les rares anaérobies obligatoires connus jusqu'à présent et doués du pouvoir fermentateur ne le peuvent que s'il y a des substances réductibles dans le milieu où ils vivent, et que l'on peut démontrer chez ces formes un pouvoir réducteur constant.

Mais revenons à notre sujet plus immédiat.

Je ne puis indiquer un moment déterminé, caractérisant la fin de la fermentation butylique. Le vif dégagement de gaz qui accompagne le développement abondant des bactéries, dure, suivant les circonstances, de deux à trois jours. Au bout de trois jours cependant tout développement ultérieur est à peine sensible, et la production d'alcool butylique cesse également. La production de gaz au contraire peut continuer encore des semaines entières à la température ordinaire. Pendant que cette fermentation secondaire s'accomplit, le liquide devient de plus en plus fluide, et l'image microscopique montre que les bactéries disparaissent en partie. L'organe à granulose ainsi que le protoplasme incolore diminuent considérablement de volume, et l'on peut avoir de la difficulté à montrer encore, dans des cultures conservées un certain temps, la présence, au moyen de l'iode, de la granulose. Les spores restent naturellement inaltérées, mais perdent au bout d'un an leur pouvoir de germination. Tous ces phénomènes, à l'exception de la fermentation secondaire, sont peut-être indépendants de la présence ou de l'absence d'oxygène, et peuvent tenir simplement à la disparition des substances nutritives. La fermentation secondaire au contraire semble exiger des traces d'oxygène libre, peut-être parce que les matières réductibles ont disparu.

§ 8. Sur les gaz de la fermentation butylique et sur l'alcool butylique.

Les formes aérobies des *Granulobacters* jouent le rôle principal dans les fermentations spontanées des bouillies de farine crue qui s'observent journellement dans la pratique et provoquent le dégagement tumultueux de gaz qui les caractérisent. Je pourrais donc commencer tout naturellement par la description de ces phénomènes. Je préfère cependant renvoyer ceci à une autre occasion, et traiter ce point à propos de l'historie du *Granulobacter saccharobutyricum* et du ferment lactique. Cela m'entraînerait trop loin, en effet, de m'étendre aussi longuement que leur importance l'exige, sur les phénomènes particuliers que l'on observe à ce propos; d'autant plus que tout ce que l'on a publié jusqu'à présent sur les bactéries de la pâte de pain n'a guère de signification. Les points qui intéressent réellement aussi bien la pratique que la science n'ont pas même été effleurés, et la question ne saurait donc être résolue en peu de mots.

La production de gaz accompagnant la fermentation butylique est très-violente. Il ne faut, quand on se sert de ballons d'un litre, que quelques heures pour récolter plusieurs centaines de centimètres cubes de gaz. Il est donc facile de faire en un petit nombre de jours une série entière d'analyses. Comme on ne peut songer à atteindre ici le plus haut degré de précision, on se servira avec succès de la méthode de Hempel et de pipettes à boules. Le premier résultat auquel on arrive, c'est que depuis le début jusqu'à la fin de la fermentation les gaz ne se composent que d'hydrogène et d'acide carbonique, et se laissent donc complètement absorber par le noir de palla-

dium et la potasse caustique. Il ne reste, après l'absorption de ces éléments, pas trace de méthane ou d'autres hydrocarbures [1]).

Aussi longtemps que la forme »à oxygène« du ferment butylique prédomine dans les fermentations, le volume d'hydrogène dépasse de beaucoup celui de l'acide carbonique. Dans ce premier stade du processus, coïncidant toujours avec la présence dans les moûts d'une quantité plus ou moins grande de glucose, la composition moyenne des gaz produits correspond à $CO_2 + 4\ H_2$, c'est-à-dire un volume d'acide carbonique sur quatre volumes d'hydrogène.

Du moment que l'anaérobiose devient plus complète la teneur des gaz en hydrogène devient plus forte. Quand la fermentation est pleinement en train, c'est-à-dire quand les bactéries se développent le plus rapidement et que l'alcool butylique se produit en quantité le plus considérable, le rapport des volumes est $CO_2 + H_2$, c'est-à-dire volumes égaux. Cette proportion peut se conserver dans les stades suivants, ou bien l'augmentation relative de la quantité d'acide carbonique continue. Si cette dernière éventualité se réalise, la composition qui s'observe finalement correspond à $5\ CO_2 + H_2$, c'est-à-dire cinq fois plus d'acide carbonique que d'hydrogène. Dans le cours des fermentations secondaires, surtout celles qui s'établissent à basse température, la teneur des gaz en hydrogène augmente de nouveau légèrement.

Il est remarquable que des colonies différentes provenant d'une même culture pure ne donnent pas, ensemencées dans des moûts de composition identique, les mêmes résultats au point de vue de la composition des gaz formés. Je ne puis dire avec certitude comment il faut expliquer ce phénomene, mais je crois qu'il est provoqué par la prédominance dans les colonies de l'une ou de l'autre forme, clostridienne ou à oxygène, du ferment butylique. Je dois cependant faire remarquer que même dans le stade initial de la fermentation pendant lequel la forme à oxygène possède encore la prépondérance, l'indigosulfate de sodium est déjà réduit à l'état d'indigo blanc. Si donc, ce que je considère comme probable, c'est la présence ou l'absence d'oxygène qui cause les variations dans le rapport des gaz produits, c'est la réserve d'oxygène solide du plasma bactérien, et peut-être aussi celle que le moût retient chimiquement qui peut seule être en jeu, et non l'oxygène en solution physique.

Il ressort de ce qui précède qu'il serait illusoire de prétendre donner de la fermentation butylique une formule propre à exprimer quantitativement les gaz formés dans le phènomène. C'est évidemment la substance des bactéries elle même, produite pendant la fermentation en quantité énorme et impossible à exprimer par une formule chimique, qui rend vaine toute détermination des rapports numériques.

Le rendement en alcool butylique échappe également encore à toute détermination précise. Tout ce que je puis dire, c'est que les levains butyliques, ensemencés artificiellement au moyen de bactéries sèches et exempts dès le début de *Gr. saccharobutyricum*, fournirent à la distillation 1 à 3% du poids de la farine d'orge en alcool

[1]) Le gaz des marais ne peut donc être un produit de fermentation butylique. Le *Granulobacter saccharobutyricum*, lui non plus, ne donne jamais de méthane. Je signale ce fait parce que M. Hoppe-Seyler attribue la fermentation du méthane au »*Bacillus Amylobacter*.« Quant au *Granulobacter lactobutyricum*, tout ce que je puis en dire c'est que cette bactérie ne donne aux dépens du lactate de calcium que de l'hydrogène et de l'acide carbonique, et n'a pas réussi dans mes expériences à attaquer les hydrates de carbone.

butylique. De bonnes fermentations principales me donnèrent jusque 1 à 2% d'alcool, rapporté au poids de farine. Il n'y a pas moyen, à cause de la production de zooglée, de déterminer au saccharomètre le degré de fermentation.

L'alcool bout à 117° C. environ et se dissout à 15° C. dans environ 10 parties d'eau, d'où l'on peut le séparer au moyen de chlorure du calcium. La rectification fournit une petite quantité d'un alcool à point d'ébullition inférieur, peut-être de l'alcool propylique. Le produit est d'ailleurs très-pur. Si l'alcool butylique était un corps important au point de vue technique, mon procédé permettrait de le préparer en grand et à frais très-modérés.

§ 9. Récolte des bactéries butyliques. Leur teneur en azote.

La fertilité des fermentations butyliques bient vigoureuses est si considérable, que les moûts butyliques (ne s'acidifiant pas) absolument privés d'oxygène finissent par devenir complètement filants. Il est très-intéressant de précipiter la zooglée bactérienne d'un liquide fermenté de cette nature. Cela réussit d'une manière presque parfaite avec l'alcool fort. Celui-ci coagule la zooglée et permet de l'enlever en une seule masse collante, comme de la fibrine, à l'aide d'une baguette de verre. On peut exprimer la masse jusqu'à siccité presque complète sur une plaque de verre épais. Le liquide fermenté ainsi très-complètement éliminé, et la zooglée devient une plaque assez résistante, blanche ou un peu brune, exclusivement formée de bactéries. Desséchée à 37° au thermostat, la masse peut être facilement pulvérisée. Les spores du ferment butylique y sont toutes vivantes; les bactéries elles-mêmes ne sont que partiellement tuées.

La précipitation complète de la zooglée parfaitement pure a lieu quand la quantité d'alcool ajoutée a porté la concentration du moût à 60% environ en teneur d'alcool absolu. Si l'on continue à ajouter encore plus d'alcool, les dextrines non fermentées se précipitent également, et enfin aussi des substances extractives azotées non assimilées par les bactéries. J'ajouterai encore que ce remarquable phénomène ne peut avoir lieu qu'une seule fois. Cela veut dire que si l'on délaie dans de l'eau une zooglée déjà une fois exprimée, on n'obtient par l'addition d'alcool qu'un précipité diffus que l'on ne parvient qu'imparfaitement à laver et qui ne se récolte pas sans peine. Quiconque voudra répéter cette expérience devra aussi songer que la précipitation doit avoir lieu à l'époque de plus grande maturité de la fermentation, ou du moins aussitôt que celle-ci est terminée. Plus tard on n'obtient plus que des précipités diffus et incommodes à manipuler. Il va de soi qu'en raison de la consommation d'alcool ce procédé n'est pas bon marché. Et cependant on peut avec raison le considérer comme un procédé industriel, et s'il fallait préparer le ferment butylique en grand, comme la levûre panaire, la méthode que je viens de décrire serait certainement appliquée avec succès. Elle est dans tous les cas digne d'intérêt, en permettant de se procurer en grand, dans un but scientifique, une espèce de bactéries des plus remarquables.

Obtenu comme je viens de le décrire, le ferment butylique se présente sous forme d'une masse cassante, blanche ou brune, sans saveur, d'une odeur faible et agréable et renfermant environ 15% d'eau. On observe sur la cassure que l'intérieur de la masse est d'ordinaire plus légèrement coloré que la surface, ce qui prouve qu'il s'y rencontre

des substances facilement oxydables. Reduite en poudre et délayée dans de l'eau, la masse gonfle bientôt et passe à l'état d'une zooglée muqueuse consistante, montrant au microscope l'image la plus caractéristique du ferment butylique. La poudre n'offre pas trace de propriétés tryptiques, mais présente au contraire un pouvoir amylolytique intense, même alors que les bactéries qu'elle renferme ont déjà péri. C'est ce qu'on peut observer d'une manière particulièrement élégante au moyen de la méthode de la diffusion dans une plaque mince de gélatine contenant de l'empois d'amidon. On dépose à la surface un peu de la poudre, abandonnant le tout à lui-même pendant douze heures ou davantage. Puis on verse sur la plaque une solution d'iode. C'est donc une expérience de même nature que celle décrite à propos des colonies butyliques. La diastase butylique diffuse dans la plaque de gélatine amidonnée et y fait apparaître une aire de diffusion circulaire, qui ne se colore plus par l'iode. Si l'on a appliqué sur la plaque un peu d'une poudre fraîche, les bactéries peuvent dans ces conditions passablement défavorables montrer cependant des phénomènes vitaux. Elles se créent en effet, au centre de la zooglée formée par imbibition, un milieu exempt d'oxygène, où elles peuvent donc se mouvoir et même présenter la sporulation et des indices de croissance. Le développement toutefois cesse bientôt par suite de l'insuffisance du substratum nutritif. La poudre est riche en granulose et se colore en noir violet par l'iode. Longtemps bouillie avec de l'eau, elle ne cède à celle-ci qu'une petite quantité de granulose, mais cependant assez pour colorer l'eau en bleu quand on y ajoute de l'iode. Une longue ébullition en présence d'acides fait disparaître la granulose et passer en solution de la dextrine et du sucre. Cette métamorphose toutefois ne se fait pas sans peine. Il est beaucoup plus commode de saccharifier la granulose par les préparations d'amylase les plus diverses.

Un litre de moût de 11 degrés saccharométriques me donna environ 30 gr. de zooglée bactérienne complètement exprimée entre des plaques de verre; 7 gr. de bactéries séchées à l'air et, comme celles-ci renferment encore 14 à 17% d'eau, 6 gr. environ de substance bactérienne séchée à 110° C.[1]). La teneur en azote de cette masse sèche est quelque peu différente, suivant l'état de la fermentation. C'est ainsi que je trouvai dans un échantillon précipité d'un moût à peu près privé de glucose, au stade le plus actif de la fermentation, d'après le procédé de Kjehldahl, 4,01% d'azote, ce qui donne, multipliant par le facteur 6,25, 25,06% d'albumine. Une fermentation butylique mise en train avec 2% de glucose me donna, dans la substance bactérienne séchée à 110° C., 4,395% d'azote ou 27,468% d'albumine. Si l'on veut comparer ces résultats à ceux fournis par un autre agent de fermentation, je rappellerai que les variétés de levûre panaire les plus actives que l'on trouve dans le commerce donnent à peu près deux fois autant d'azote, savoir 7 à 9%.

Si l'on admet que les bactéries vivantes renferment 80% d'eau (la levûre panaire est censé en renfermer 70 à 75%), les 20 gr. de substance bactérienne restants, rapportés à 27,46% d'albumine, renferment 5,59 gr. d'albumine, qui doit donc, imbibée avec de l'eau, constituer le corps protoplasmique des bactéries. L'organe à granulose constitue 25 à 50% du corps des bactéries vivantes[2]), et est donc incontestablement

---

[1]) Il est remarquable qu'un litre du même moût donnerait également environ 30 gr. de levûre de bière, mais seulement par le procédé de l'aération.

[2]) Même 60% chez le *Granulobacter saccharobutyricum.*

lui-même de nature protoplasmique. Les spores donnent, mesurées au microscope, un volume d'environ 10% du volume total du corps. Je ne me hasarderai pas à apprécier le volume des enveloppes gélatineuses.

Les bactéries récoltées comme il vient d'être dit et conservées durant des années ne perdent pas leur pouvoir végétatif. J'ai obtenu par exemple dans le courant de l'été dernier des fermentations butyliques vigoureuses en ensemençant mes ballons à l'aide d'organismes récoltés en 1887. Il y a d'ailleurs un moyen plus simple de se persuader de la vitalité persistante des matériaux conserves; c'est de fabriquer du levain butylique. On fait bouillir à cet effet un peu de farine, absolument comme on procède dans la farbication du levain brut, mais on prolonge l'ébullition jusqu'à ce que tous les organismes y renfermés aient été tués. Cela arrive presque toujours au bout de 10 à 15 minutes, et sans exception, au bout d'une demi-heure.

On introduit alors, au moyen d'une cuiller de platine, la poudre bactérienne à examiner à une certaine profondeur dans l'intérieur de la masse refroidie à environ 95° C., et de telle manière que les bactéries soient en contact avec la paroi de verre. La poudre se gonfle aussitôt en une volumineuse zooglée. On observe au bout de quelques heures que la boullie devient liquide à l'endroit infecté, par suite de l'action de l'amylase butylique secrétée par la zooglée. Les bactéries sont-elles vivantes, on voit au bout de 24 heures, à une température de 37° C., cette portion liquéfiée se remplir d'une quantité de bulles de gaz; l'odeur agréable de l'alcool butylique devient perceptible et les clostridiums se répandent dans la masse entière de la bouillie. Il faut dans cette expérience, quand on ensemence au moyen de la cuiller de platine, éviter d'entraîner de grosses bulles d'air, ce qui d'ailleurs arrive très-facilement. Il va de soi qu'un levain butylique de cette nature peut servir à mettre en train une nouvelle fermentation.

§ 10. La granulose et l'amylase granulobactériennes.

Le dépôt de granulose au centre du corps des bactéries, qui secrètent en quantité de la diastase par leur surface, est un bel exemple de la séparation complète que peut établir le protoplasme vivant entre substances qui au contact agissent énergiquement les unes sur les autres.

Les deux processus ont bien lieu en même temps. C'est ce qu'apprend l'accumulation de diastase dans le cours des fermentations butyliques, en même temps que se multiplient activement les clostridiums remplis de granulose. Une goutte d'iode colore le liquide fermentescible en bleu violet foncé.

Ces observations permettent d'attendre que les zooglées précipitées des liquides butyliques au moyen d'alcool seront à la fois riches en granulose et en diastase. C'est en effet ce qui a lieu. Il reste d'ailleurs beaucoup de diastase dans les eaux mères.

A propos de la détermination de ce corps dans les zooglées précipitées je ferai encore remarquer ce qui suit.

Si l'on introduit dans la masse d'une pâte de farine refroidie à 95° C. un peu de zooglée sèche, réduite en poudre; si l'on expose ensuite la substance à une température de 47° C.; il y apparaît déjà au bout de quelques heures, comme nous l'avons vu au § 9, un foyer de liquéfaction.

Mais ce phénomène peut être accompagné d'un certain développement des bac-

téries, et l'on pourrait donc croire à une formation nouvelle de diastase. C'est pourquoi je veux faire remarquer que des zooglées tuées par un séjour dans l'éther ou le chloroforme peuvent montrer la même réaction. Il est à recommander de ne pas ajouter la préparation à la pâte vers 95° C., mais à une température plus basse, inférieure à 70° C., sinon la diastase en souffre.

La zooglée butylique pulvérisée, ou une préparation d'amylase qui en provient [1]), ajoutées vers 50 ou 60° C. à de l'empois d'amidon épais, produisent également un liquéfaction rapide. Il se forme d'abord beaucoup de dextrine, qui ne tarde pas à disparaître et est remplacée par du maltose. Je ne puis cependant dire exactement le marche suivie par le phénomène. Ce que je sais, c'est qu'on ne saurait le comparer à la production de sucre par la diastase du malt, car cette action repose sur la coopération de deux zymases, tandis que l'amylase butylique est un corps simple.

Ce dernier corps est d'ailleurs étroitement allié à la diastase du malt en ce sens que l'optimum de température de l'amylolyse est pour les deux zymases d'environ 60° C. Toutes deux sont rendues plus actives par l'addition d'une trace d'acide et fortement paralysées par les bases. La ptyaline et la diastase du pancréas qui lui est identique sont au contraire stimulées par une trace d'un composé alcalin. L'amylase butylique devient enfin plus ou moins inactive au-dessus de 60° C. et est précipitée alors de ses solutions en coagulum absolument comme la diastase du malt. Il est probable que la température de décomposition rapide de l'amylase butylique est voisine de 75° C., supérieure par conséquent à celle de la diastase du malt, pour laquelle elle est d'environ 68° C.

Le maltose produit par l'amylase butylique est probablement identique au maltose ordinaire. Les »levûres du maltose« peuvent dans tous les cas transformer ce sucre en alcool et acide carbonique. Il n'est pas assimilé par les »levûres glucosiques«, telles que le *Saccharomyces Mycoderma*, et les »levûres lactosiques« comme les *Saccharomyces Kefyr* et *S. tyrocola*, dans les plaques de gélatine ensemencées avec ces microbes.

La formation d'érythrodextrine est dans l'amylolyse butylique un phénomène qui se termine plus rapidement que dans l'action de la diastase du malt d'orge. Elle est cependant nettement appréciable, absolument comme dans l'action de la granulase du malt de maïs, qui est très-voisine de la diastase butylique. Il n'y a pas production de glucose dans l'interversion par l'amylase butylique, tandis que la diastase ordinaire du malt, par suite d'une faible teneur en glucase, donne des traces de glucose. Ce sucre ne fait donc jamais complètement défaut dans les extraits de malt, mais ne se trouve pas du tout dans les levains butyliques préalablement bouillis.

C'est peut-être ici le moment de dire un mot de la dissolution de la cellulose sous l'influence du »*Bacillus Amylobacter*«. Ce phénomène, dévouvert par Mitscherlich [2]), a plus tard souvent été discuté. J'ai essayé par plusieurs méthodes d'acquérir des données sûres au sujet du rôle du ferment butylique dans ce phénomène. J'ai

---

[1]) Pour obtenir celle-ci le plus simple est de filtrer un moût en fermentation vigoureuse et de précipiter la liqueur filtrée par l'alcool. Ou bien on éliminera d'abord au moyen d'alcool la zooglée du moût en fermentation, et l'on précipitera les eaux mères par un excès d'alcool, ce qui entraîne il est vrai une grande quantité de dextrine, mais très-peu de bactéries.

[2]) *Kön. Preuss. Acad. d. Wiss.* 1850. p. 105.

examiné d'abord à ce point de vue la diastase butylique, en déterminant son influence sur la cellulose de provenance diverse. Je préparai donc de la cellulose à l'aide de papier à filtrer, de noyaux de dattes, des cotylédons du *Tropaeolum majus*. La substance, dissoute dans le réactif de Schweizer, fut précipitée par l'acide chlorhydrique et complètement débarrassée du cuivre adhérent. Il s'est montré que l'amylase butylique est tout à fait inactive à l'égard de la cellulose ainsi obtenue; seuls l'empois d'amidon et les dextrines furent attaqués.

Quand ces expériences eurent donné un résultat négatif, j'introduisis les préparations cellulosiques dans les liquides de fermentation butylique, mais sans plus de résultat. J'ai alors placé dans les mêmes liqueurs des tiges de lin, bouillies ou non, séchées et fraîches; mais au bout de 24 heures et davantage je ne pus observer de corrosions visibles des fibres libériennes. Des coupes minces de radis restèrent également intactes; de sorte que je conclus de tout ceci que la dissolution de la cellulose, qui peut sans aucun doute s'opérer par l'intervention de microbes, doit être rapportée à un processus physiologique encore inconnu et n'est pas à coup sûr provoquée par les cultures pures du *Granulobacter*. Le fait suivant est d'ailleurs en harmonie avec cette manière de voir. M. van Senus[1]), qui a étudié en détail la disparition de la cellulose sous l'influence des microbes, arrive à ce résultat qu'il doit y avoir ici une action vitale de contact (comme dans la datte en germination), et qu'an moins deux espèces de microbes doivent être en même temps en présence pour provoquer le phénomène. On ne saurait trancher en ce moment la question de savoir quelles sont ces espèces. Peut-être le *Granulobacter Polymyxa* est-il une d'entre elles.

M. Hoppe-Seyler[2]) admet que la fermentation cellulosique est liée à la production de méthane, mais ceci doit encore rester sujet à caution. Il ne me semble pas suffisamment prouvé que dans ses recherches le méthane ne provenait pas de substances albuminoïdes.

§ 11. Signification biologique des fermentations. Fonction réductrice du ferment butylique.

J'ai déjà fait remarquer à une autre occasion[3]) que le fait capital des fermentations réside dans la production de gaz.

Il serait désirable que d'autres auteurs prissent en considération ma manière de voir. Je suis persuadé qu'alors toutes sortes de dédoublements sous l'influence de bactéries, tels que la production de pigment, la réduction, l'oxydation, production de lumière, etc., phénomènes souvent nommés fermentations, prendraient une autre place dans la classification physiologique.

Toute fermentation, à mon avis, est caractérisée en première ligne, comme je viens de le dire, par la production de gaz. A ce point de vue, toutes les fermentations qui donnent de l'hydrogène, et cela arrive chez la majorité d'entre elles, doivent être

[1]) A. H. C. van Senus. Bijdrage tot de kennis der cellulosegisting. Leiden 1890.

[2]) L'intéressante étude de M. Hoppe-Seyler se trouve sous le titre: »Ueber die Gährung der Cellulose mit Bildung von Methan und Kohlensäure« dans son *Zeitschrift für Physiol. Chemie*. Bd. X, Heft 3, page 201, et Heft 5, page 401, 1886.

[3]) *Centralbl. für Bacteriologie*, Bd. 11, pag. 73, 1892.

considérées comme le prototype du genre. Cet élément répond en effet, à cause de sa faible solubilité, beaucoup mieux que l'acide carbonique à l'idéal d'un gaz.

Si le vrai caractère de la fermentation est la production de gaz, c'est ce dernier phénomène qui doit constituer sa signification biologique. Voici comment il faudra, je crois, comprendre ce qui précède. Le vrai théâtre de l'activité des organismes de fermentation sont les couches situées immédiatement sous la surface du sol des jardins, les prairies et les champs de culture, les masses d'engrais et de détritus, la boue des fossées, des lacs et des fleuves, les couches profondes des cuves de la fermentation industrielle, en somme tous les endroits où, par suite de la vie intense qui s'y développe, l'oxygène libre est rapidement consommé et ne peut se renouveler que difficilement. Les gaz de fermentation qui prennent ici naissance doivent tendre nécessairement à refouler les organismes producteurs de ces endroits de formation et les transporter ailleurs, où les conditions de nutrition sont différentes. Ce mouvement doit en général être dirigé vers la surface libre de ces masses, c'est-à-dire vers l'oxygène libre. J'admets maintenant que le développement ultérieur des organismes de la fermentation dépend d'une manière ou d'une autre de l'oxygène libre. C'est dans la nécessité d'aller chercher l'oxygène, qui seul finit par rendre possible la suite de la fermentation, même chez les êtres anaérobies, que je vois la vraie signification de la fonction fermentative [1]). Or, ceci admis, il est évident qu'il faut un moyen pour remettre en contact avec l'oxygène libre les formes possédant le pouvoir d'accumuler une réserve d'oxygène solide, dont elles peuvent vivre quelque temps et se développer aux endroits où, par suite de l'absence de cet élément, les aérobies ne peuvent se maintenir. Eh bien, y-a-t'il, pour atteindre ce but, un meilleur moyen que la production de gaz? Il n'y a pas d'autre raison, à mon avis, que la nécessité d'absorber de nouveau de l'oxygène libre, après que la réserve en a été consommée, qui fait que les gaz de fermentation poussent à la surface des liqueurs les zooglées bactériennes ou la mousse de levûre. Cette nécessité n'explique-t'elle pas d'ailleurs suffisamment le fait autrement incompréhensible que précisément l'hydrogène, qui réclame une si grande dépense d'énergie pour prendre naissance, est plus encore que l'acide carbonique le produit caractéristique des si nombreuses fermentations bactériennes?

Mais ici nous nous heurtons à une contradiction apparente. J'ai décrit le ferment butylique comme complètement anaérobie. J'ai montré que la fermentation butylique et le développement du ferment cessent au contact de l'oxygène. L'acide carbonique et l'hydrogène de cette fermentation devraient-ils néanmoins servir à amener le ferment en présence de cet oxygène qu'il redoute? Je réponds à cette question, qui longtemps m'a créé des difficultés considérables, de la manière la plus franchement affirmative, et j'appuie ma réponse sur les arguments suivants.

Nous avons toujours supposé dans les considérations précédentes sur la fermentation butylique que le corps fermentescible était du moût, doué d'une affinité énergique pour l'oxygène. Nous avons vu que la vitalité et le pouvoir de multiplication du ferment butylique dans un moût de cette nature, saturé d'oxygène combiné, mais privé d'oxygène libre (où la levûre ordinaire périt après environ trente divisions cellulaires), sont indéfinis. Dans un volume déterminé cependant, après un certain nombre de divisions,

---

[1]) Je ne parle ici que des êtres anaérobies de la première classe mentionnée pag. 43. Note 1. Les anaérobies de la putréfaction des peptones etc. restent hors de considération.

ce développement doit cesser par défaut de nourriture. Mais il ne suit nullement d'autre part de cette puissance de développement indéfini dans des milieux nutritifs particuliers que la même chose doive avoir lieu dans les liquides de constitution si différente que l'on rencontre dans les stations naturelles des bactéries. Je parle ici avant tout de la boue des fossés et des infiltrations de l'humus. On ignore il est vrai les transformations que le ferment butylique pourra y provoquer, mais nous pouvons par analogie conclure avec beaucoup d'apparence de raison qu'il s'y développera également une fermentation donnant de l'alcool butylique, de l'hydrogène et de l'acide carbonique. Or, il est très-peu probable que ces liquides naturels aient au même degré que le moût le pouvoir de fixer de si grandes quantités d'oxygène; et le ferment butylique s'y conduit peut-être autrement envers l'oxygène libre et en réclame davantage. Ceci a lieu en tous cas dans des solutions nutritives artificielles dans lesquelles j'ai cultivé le ferment. J'y ai réussi p. ex.avec de l'eau de conduite renferment 1% de peptone sec et ½% d'empois d'amidon à une température assez basse, dépassant à peine 10 à 12° C. La cultnre avait lieu dans des ballons de Pasteur, où l'air avait accès. Le développement était très-lent, mais finalement de petits clostridiums avec spores étaient généralement visibles et la présence d'alcool butylique évidente. L'hydrogène se laissait également démontrer. Mais ce qui est de la plus haute importance pour les considérations présentes, c'est le fait qu'une pareille solution se montre beaucoup moins propre au développement et à la fermentation dans mes ballons, c'est-à-dire à l'abri de l'air, que dans des ballons ordinaires, où l'oxygène avait accès à travers la fermeture suivant le dispositif de Pasteur. Dans ce milieu il fallait donc une bien plus grande quantité d'oxygène au ferment butylique que dans le moût; et il en sera donc bien encore ainsi, sans le moindre doute, pour la boue et les infiltrations de l'humus. Il est donc certain que dans leurs stations naturelles les anaérobies ont besoin de plus d'oxygène qu'on ne le croirait d'après les résultats des expériences avec les moûts artificiels, riches en sucre et en peptones.

Je crois donc qu'il n'y a pas contradiction entre ces phénomènes d'anaérobiose obligatoire et l'explication que je donne de la fonction fermentative. Dans l'anaérobiose la production de gaz a également pour but de pousser l'agent fermentateur vers l'oxygène, qui le rend capable, quand la pesanteur ou des courants l'entrainent de nouveau dans les couches profondes, de fermenter et de croître avec une nouvelle énergie. Il n'y a que quelques liquides déterminés, rarement représentés dans la nature, qui permettent au ferment butylique obligatoirement anaérobie d'employer à son rajeunissement, grâce à son pouvoir de réduction, de l'oxygène combiné. La levûre de bière ne possède pas ce pouvoir.

Je ne me hasarderai pas à exprimer un avis sur la signification biologique de la production d'alcool butylique. Je crois cependant avoir un idée plus nette de l'utilité de la production d'alcool éthylique par la levûre de bière. J'espère y revenir à une autre occasion.

§ 12. Généralités sur l'anaérobiose, la fonction réductrice et la fermentation.

Pour bien comprendre ce qui a été dit § 11 et ce que je me propose de traiter à présent, c'est-à-dire un sujet passablement compliqué, il est nécessaire que je répète

certains faits dont il a déjà été antérieurement question. Je devrai surtout appeler l'attention sur les deux formes très-différentes d'anaérobiose facultative, qui n'ont pas été suffisamment distinguées jusqu'ici, même par les meilleurs physiologistes.

La première de ces formes peut être appelée l'*anaérobiose facultative permanente,* l'autre étant *l'anaérobiose facultative temporaire.* La levûre alcoolique est anaérobie facultative temporaire; le ferment lactique industriel est anaérobie facultatif permanent, ou plus brièvement anaérobie facultatif. J'ai déjà à plusieurs reprises, dans le cours de ce travail, fait remarquer que la levûre alcoolique ne peut, même dans les conditions de nutrition les plus favorables, par exexmple dans du moût, donner que quelques multiplications cellulaires, mais cesse de croître si l'oxygène lui fait défaut. Les cellules finissent d'ailleurs par mourir si elles sont maintenues à l'abri de l'air, en montrant des phénomènes de rupture très-caractéristiques. Le bourgeonnement et les phénomènes de fermentation qui l'accompagnent sont provoqués par l'existence d'une réserve d'oxygène solide et combiné; du moment que cette réserve est consommée la croissance et en même temps la fermentation cessent; la mort n'arrive que si la privation d'oxygène est de plus longue durée. Le *Mucor racemosus* se comporte absolument de même, sauf que le besoin d'oxygène est plus grand chez cette moisissure que chez la levûre alcoolique.

Pour montrer clairement chez la levûre l'existence du phénomène en question, le plus simple est de procéder comme suit.

On remplit de moût deux de mes ballons butyliques et l'on rend la matière exempte d'oxygène par l'ébullition. On ajoute alors de la levûre de bière en culture pure aux deux ballons. Le premier n'en reçoit qu'une faible trace qu'on y laisse tomber au moyen d'un fil de platine court et épais. Le second ballon est additionné d'une plus forte quantité de levûre. Si on expose les deux ballons à une température de 28° C., la différence entre leur contenu à l'un et à l'autre est déjà très-considérable au bout de 24 à 48 heures. Tous deux ont commencé à fermenter; mais le phénomène cesse complètement, par suite du manque d'oxygène, dans la ballon qui n'a reçu que quelques cellules isolées. Dans le deuxième ballon au contraire, sous l'influence de la réserve d'oxygène introduite en même temps que les cellules, la fermentation a été complète.

J'ai moi-même donné la forme ici décrite à cette expérience. Le principe toutefois en été imaginé par M. Pasteur, qui a conseillé à son élève M. Cochin d'employer à cet effet un appareil particulier, formé de ballons de verre réunis ies uns aux autres [1]).

J'ai également fait construire des appareils de cette nature; mais je me suis heurté à de nombreuses difficultés, car il est presque impossible d'éliminer même par une ébullition patiente et l'introduction d'hydrogène la totalité de l'oxygène. La vapeur ne peut s'échapper facilement des chambres contigues de l'appareil. L'emploi des ballons butyliques, qui sont si propres à réaliser un milieu privé d'air, permet d'expérimenter sur de grandes quantités de moût libre d'oxygène, où quelques cellules de levûre isolées ont bientôt consommé leur réserve solide de cet élément. Je crois que les brèves considérations qui précèdent auront suffisamment élucidé pour ce qui nous regarde la signification de l'anaérobiose temporaire de la levûre alcoolique.

[1]) *Ann. de Chimie et de Physique,* page 312, 1880

Nous avons dit que l'anaérobiose facultative permanente se rencontrait chez le ferment lactique industriel. Elle est caractérisée par ce que dans les milieux nutritifs appropriés il semble exister une indépendance complète du ferment à l'égard de l'oxygène libre. J'ai réussi à faire entrer en fermentation lactique de grandes quantités de vinasse renfermant du saccharose, l'air en ayant été chassé par ébullition, rien qu'en y introduisant une portion minime du ferment. Le phénomène fut accompagné d'un dégagement si énorme d'acide carbonique, que seul l'examen microscopique a pu me convaincre de l'absence de fermentation alcoolique. Or il importe de remarquer pour notre objet qu'en premier lieu le ferment lactique développe une fonction réductrice particulièrement intense; et qu'ensuite je n'ai pu réussir à provoquer une croissance évidente du ferment dans un milieu privé d'oxygène, si des corps réductibles faisaient complètement défaut. Je crois donc que dans ce cas aussi de l'oxygène doit être fourni de temps en temps, et que la fonction fermentative peut être utile à ce point de vue.

On pourra donc, d'après ce qui précède, exposer brièvement comme suit la relation entre le pouvoir réducteur et les trois classes d'anaérobies [1]):

Anaérobiose temporaire: La fonction réductrice peut faire défaut (ex: la levûre alcoolique) ou se rencontrer (ex: le *Granulobacter Polymyxa).*

Anaérobiose facultative permanente: La fonction réductrice est toujours très-développée (ex: le ferment lactique industriel).

Anaérobiose obligatoire: La fonction réductrice est toujours vigoureuse (ex: le ferment butylique) [2]).

Examinons maintenant d'encore un peu plus près la relation entre les fonctions fermentative et réductrice.

On a prétendu que toute cellule vivante pouvait dans certaines circonstances développer un pouvoir réducteur. S'il s'agit, comme dans le cas présent, d'un effet sensible au dehors de la cellule, cette affirmation est incontestablement erronée. Elle n'est pas même toujours exacte pour les bactéries, car il y a des espèces chez lesquelles des expériences diverses et multipliées n'ont jamais pu faire constater de fonction réductrice. Je rappellerai par exemple les bactéries des Papilionacées. On pourrait croire que la fermentation est intimement liée comme phénomène physiologique à des processus de réduction, mais ceci non plus n'est pas toujours vrai. Outre la levûre de bière, je connais encore quelques bactéries de fermentation incapables de réduire l'acide indigosulfurique et les nitrates [3]).

Je soutiens au contraire, sur la foi de mes observations, encore peu nombreuses il est vrai, et d'accord avec ce qui précède, que tous les organismes obligatoirement anaérobies et tous les anaérobies facultatifs possèdent des propriétés réductrices. Je crois donc devoir admettre une dépendance réciproque et nécessaire entre l'anaérobiose vraie et la réduction. Il y a dépendance en ce sens que l'anaérobiose

---

[1]) Voir F. Cahen, Ueber das Reductionsvermögen der Bacterien. *Zeitschr. f. Hygiene.* Bd. II. p. 386, 1887.

[2]) Voir Note 1, pag. 59.

[3]) Les nombreuses affirmations contraires relatives à la levûre alcoolique sont erronées et s'expliquent parce que les compagnons constants des levûres de la bière et du pain, savoir les ferments lactiques, appartiennent aux bactéries les plus puissamment réductrices. Les auteurs qui ont l'occasion de manipuler la levûre alcoolique en culture pure se convaincront sans peine de la vérité de ce que j'avance.

vraie, ininterrompue, n'est possible que si les organismes qui l'accomplissent sont réducteurs et disposent de matériaux nutritifs réductibles. On ne doit pas être tenté de croire superflu ce dernier membre de phrase, car la vie des vrais anaérobies est en effet possible sans qu'il y ait anaérobiose, mais ils emploient alors de l'oxygène libre et des matériaux nutritifs non susceptibles de réduction. J'en ai cité un exemple plus haut à propos du développement du ferment butylique en culture pure dans une solution de peptone et d'amidon, quand l'air a indubitablement quoique faiblement accès. J'ai fait ressortir que dans pareille solution l'élimination complète de l'oxygène par l'ébullition, par exemple, ne permet plus qu'un faible développement bien vite arrêté [1]). Or, je crois que dans ce dernier cas l'anaérobiose n'a pas lieu pour cette raison, que des substances réductibles font défaut ou ne sont présentes qu'à l'état de traces. Le moût au contraire en renferme de grandes quantités. L'exemple de la solution de peptone et amidon montre que la question est propre et prête à être expérimentalement examinée; il suffit que les expériences soient faites de telle manière que l'on ne fasse usage que de solutions artificielles, privées de peptone. Il y a sans doute ici une difficulté, qu'il ne serait pas très facile d'éviter si l'on voulait obtenir des fermentation aussi vigoureuses que dans les moûts de céréales. S'il y avait moyen d'isoler, comme des individus chimiques, les substances réductibles de ces moûts, on aurait réalisé dans cette direction un progrès important. Mais plusieurs indices semblent montrer que les peptones du malt jouent ici le premier rôle, et je dois observer que les peptones en général, et surtout ceux du malt, me semblent peu propres, à cause de leur propriété d'absorber un peu d'oxygène, à résoudre la question. Même le peptone sec du commerce permet d'observer dans certaines circonstances une faible absorption d'oxygène sans qu'il y ait des germes organisés en présence. L'expérience citée ci-dessus, avec le peptone et l'amidon, substances qui permettent encore une faible croissance du ferment butylique, perd il est vrai de sa valeur par les circonstances signalées, mais si l'on admet la théorie ici défendue, la croissance observée s'explique par l'oxygène combiné au peptone, c'est-à-dire par l'existence d'une substance réductible.

Je rassemblerai en terminant en un court résumé mes idées sur la relation entre fermentation, anaérobiose et fonction réductrice. J'établis ainsi les thèses suivantes.

1. Il y a trois différentes formes d'anaérobiose, savoir 1° l'anaérobiose facultative vraie; 2° l'anaérobiose facultative apparente ou temporaire; 3° l'anaérobiose obligatoire [2]).

2. L'*anaérobiose facultative*, celle du ferment lactique industriel par exemple, est caractérisée par l'indépendance à l'égard de l'oxygène libre, quand il y a en présence des matériaux nutritifs susceptibles de réduction.

L'*anaérobiose temporaire*, telle que celle du *Mucor racemosus*, des levûres alcooliques et de quelques bactéries de fermentation, telles que le *B. coli*, le *Photobacterium phosphorescens*, repose sur la présence d'une réserve d'oxygène combiné dans les cellules, permettant chez les levûres alcooliques actives un petit nombre (vingt à trente) de divisions cellulaires, avant que le contact avec l'oxygène soit de nouveau nécessaire. Si cela n'arrive pas, les cellules meurent peu à peu, alors même qu'il y a

---

[1]) Le faible développement qu'on observe s'explique peut-être par de l'oxygène combiné au peptone, et impossible à éliminer par ébullition

[2]) Et cette dernière encore sous deux formes distinctes.

abondance de nourriture susceptible de réduction, renferment de l'oxygène lâchement combiné.

L'*anaérobiose obligatoire*, comme celle du ferment butylique, réclame l'absence complète d'oxygène libre et la présence de matériaux nutritifs susceptibles de réduction.

3. Les fonctions fermentative et réductrice sont indépendantes l'une de l'autre. Cela résulte de ce que la levûre alcoolique temporairement anaérobie fermente sans réduire, tandis que la bactérie lumineuse le *Photobacterium phosphorescens*, fermente et réduit en même temps.

4. La fermentation peut accompagner les trois formes de l'anaérobiose, et ne fait défaut que chez les organismes absolument aérobies.

5. L'anaérobiose facultative vraie et l'anaérobiose obligatoire sont inséparables de la présence de substances nutritives réductibles.

6. La fontion réductrice peut se rencontrer combinée avec toutes les formes de l'anaérobiose, ainsi qu'avec l'aérobiose complète.

7. Les anaérobies facultatifs et les anaérobies obligatoires peuvent, en l'absence de combinaisons assimilables en même temps que réductibles, ou bien en présence de composés réductibles mais non assimilables, vivre et se développer en apparence comme des aérobies. Cela veut dire qu'ils réclament alors de l'oxygène libre, mais de faible tension.

De toutes ces thèses la dernière enfin est la moins bien établie, mais elle est, comme nous l'avons vu, de la plus haute importance pour la signification biologique des fermentations.

8. La fonction fermentative est nécessairement accompagnée de production de gaz. Quand cela n'a pas lieu on ne peut employer la dénomination de fermentation. La fermentation a pour but, par la production de gaz, d'entraîner jusqu'en contact avec l'oxygène les agents de fermentation appartenant à une des trois classes anaérobies citées. L'optimum fonctionnel de la tension d'oxygène est, pour les anaérobies obligatoires, quand il y a des substances nutritives réductibles en présence, égal à o; quand il n'y en a pas, il est supérieur à o, mais inférieur à la solubilité correspondante de ce gaz sous la pression atmosphérique normale.

Ueber Spirillum desulfuricans als Ursache von Sulfatreduction.

Archives Néerlandaises des Sciences Exactes et Naturelles, Haarlem, Tome XXIX, 1896, p. 233–277. — Verscheen onder den titel »Over sulfaatreductie door Spirillum desulfuricans« in Verslagen Kon. Akademie van Wetenschappen, Wis- en Natuurk. Afd., Amsterdam, Deel III, 1894, blz. 72—82, en onder den titel »Ueber Spirillum desulfuricans als Ursache von Sulfatreduktion« in Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde, Jena, II. Abteilung, I. Band, 1895, S. 1—9, 40—59, 104—114.

1. Allgemeines.

Die Bildung von Schwefelwasserstoff und anderen Sulfiden unter dem Einfluss des Lebens ist eine Naturerscheinung von grossem Umfange, und wichtig sowohl aus rein wissenschaftlicher Rücksicht, wie aus geologischen und hygienischen Gründen. In biologischer Hinsicht liegt das Hauptgewicht des Vorganges in der Existenz einer ziemlich umfangreichen Flora und Fauna, spezifisch an Schwefelwasserstoff adaptierter Organismen, wozu Infusorien, Flagellaten und Bakterien gehören und wahrscheinlich auch mehrere grüne oder anders gefärbte Algen [1]). Die geologische Bedeutung erhellt schon daraus, dass der Schlamm von ganzen Seen und selbst von gewissen Meeren reich beladen ist mit Schwefeleisen. So soll der Boden des Schwarzen Meeres mit einer enormen, Schwefeleisen führenden Schlammschicht bedeckt sein, über welchem das Meereswasser bis zu einer beträchtlichen Höhe schwefelwasserstoffhaltig ist. In einer Tiefe von 2125 m wurden nicht weniger wie 6,5 cm^3 Schwefelwasserstoff pro Liter gefunden [2]). Die Hauptmasse dieser Schwefelverbindung rührt von der Reduktion von Sulfaten her, ein kleiner Teil dürfte auf schwefelhaltige Proteïnkörper zurückzuführen sein.

Braconnot ist wohl der Erste gewesen, welcher auf das Vorkommen von Schwefeleisen im schwarzen Kloakenschlamm und im Untergrunde der Stadt Nancy hingewiesen hat, und er glaubte an irgend einen Zusammenhang davon mit der Verbreitung der Cholera [3]). Seitdem ist es allgemein bekannt, dass dieser Körper an thonigen, abwechselnd trockenen und überfluteten Meeresküsten, sowie im Schlamme

[1]) Die eigentliche an Schwefelwasserstoff adaptierte Fauna und Flora ist auf Brackwasser und Meerwasser angewiesen, und wir finden in unseren süßen Gewässern davon nur relativ wenige Repräsentanten. (Vergl. Warming, Danmarks Kyster-Bakterier. Kjøbenhavn 1876.)

[2]) Nature. Vol XLVIII. 1893. p. 323.

[3]) Examen de la boue noire provenant des égouts (Annales de Chimie et de Physique. T. L. 1832. p. 213.)

von Sümpfen, Teichen und Flüssen überall verbreitet ist, und dessen Entstehung unter Einfluss des Lebens dürfte ebenfalls allgemein anerkannt werden, wenn darüber in der Litteratur auch nur spärliche Angaben vorliegen. Hierzu kommt nun noch der merkwürdige Umstand, dass das Grundwasser der tieferen Bodenschichten, wenigstens in der Provinz Süd-Holland, vollständig, in der Provinz Gelderland ganz oder beinahe ganz schwefelsäurefrei ist, so dass die Frage sich erhebt, ob auch dieses auf einem durch Mikrobien bewirkten Reduktionsvorgang der mit dem Oberflächenwasser in die Tiefe sickernden Sulfate beruhen kann. Wenn diese Ansicht nun wirklich zutrifft, dürften die folgenden Vorgänge in den verschiedenen Bodenschichten stattfinden: 1. Nahe der Oberfläche, jedoch nur dort, wo vollständiger Sauerstoffmangel herrscht (das Sulfidferment ist, wie wir später sehen werden, streng anaërobisch), Schwefelwasserstoffbildung aus der SO^4-Gruppe der Sulfate. 2. Ebendaselbst, oder höher oder tiefer, Bildung von Schwefeleisen aus Ferri- oder Ferroverbindungen im Falle Ferrisalze einwirken unter Absetzung von regulinischem Schwefel. 3. Zersetzung des Schwefeleisens durch Kohlensäure unter Schwefelwasserstoffbildung. 4. Oxydation des Schwefeleisens oder des Schwefelwasserstoffs unter Sulfat- oder Schwefelbildung nahe der Oberfläche. 5. Bildung von Schwefelwasserstoff oder von Schwefelsäure aus etwa entstandenem freien Schwefel. Die Körper, welche dabei in die Tiefe hineinsickern können, sind Calcium- und Ferrokarbonat, Schwefelverbindungen können, wenn im Boden Sulfat reduzierende Organismen genügend vorkommen, nicht tief unterhalb der Lagerstätte der letzteren anlangen. Die Ursache, warum der Schwefel bei diesen Umwandlungen immerfort das Bestreben hat, die Bodenoberfläche zu suchen, dürfte darin bestehen, dass der Diffusionsstrom des Schwefelwasserstoffes und anderer Sulfüre eben durch die Oxydation stets gezwungen ist, dem freien Sauerstoff, d. h. dem schwefelwasserstofffreien Raume entgegenzugehen, während eine Fortbewegung in die Tiefe durch Schwefeleisenbildung verhindert wird. Die Kohlensäure bildet dagegen eben in der Tiefe lösliche Salze, welche weiter in die Erde hineindringen können.

Nach dieser Theorie muss im Tiefwasser solcher Bodenarten, wo das Sulfidferment nicht leben kann, z. B. infolge von Sauerstoffzutritt, oder durch vollständige Abwesenheit von organischer Nahrung, Schwefelsäure vorkommen.

Die Form, worin das Schwefeleisen an den obengenannten Fundorten auftritt, ist entweder diejenige des unlöslichen einfachen Sulfides (FeS) oder des Hydrates davon. Das hydratische Sulfid kann unlöslich oder mit schwarzgrüner Farbe wasserlöslich vorkommen. Ueberdies giebt Gautier an [1]), dass in den Morasten auch Pyrit (FeS^2) gebildet werde, und zwar durch Oxydation von einfachem Schwefeleisen oder Eisenkarbonat bei Gegenwart von freiem Schwefelwasserstoff [2]). Vielleicht muss diese Reaktion also als sechster Vorgang in der oben angeführten Uebersicht wahrscheinlicher Etappen der Schwefelwanderung in der Erdoberfläche eingereiht werden. Jedenfalls erscheint die Frage nach der Verbreitung des biogenen Pyrites von grossem Interesse.

---

[1]) Comptes rendus. 1893. No. 26. p. 1494. »Aussi rencontre t'on le protosulfure de fer et la pyrite dans la vase des marais, dans les terrains provenant d'anciens dépôts riches en débris animaux ou végétaux et jusque dans le soussol des grandes villes.«

[2]) Die Pyritablagerungen in den Steinkohlenflötzen dürften nach ihrem Ursprunge ebenfalls hierher gehören und auf unser Sulfidferment zurückzuführen sein.

Dass sich im Boden unter gewöhnlichen Verhältnissen kein gediegener Schwefel vorfindet, hängt offenbar mit desssen Unbeständigkeit bei Gegenwart von Wasser, worin lebende Bakterien vorkommen, zusammen, denn durch die letzteren wird das Element ziemlich leicht in Schwefelwasserstoff verwandelt. Dieses dürfte zunächst mit der Alkalibildung, welche so vielen Bakterien eigentümlich ist, zusammenhängen. Jedenfalls konnte ich mich überzeugen, dass der fein verteilte, durch Oxydation von Schwefelwasserstoff erzeugte Schwefel ebenso leicht durch sehr verdünntes Ammon, wie durch Kontakt mit Wasserbakterien, bei Luftabschluss in einen Eisensalz schwärzenden Körper übergeht.

2. Die verschiedenen Bildungsweisen des biogenen Schwefelwasserstoffes.

Schwefelwasserstoff- oder allgemeine Sulfidbildung durch Mikroorganismen kann hauptsächlich auf solche Weise stattfinden: Erstens durch Zersetzung schwefelhaltiger Proteïnkörper; zweitens direkt aus regulinischem Schwefel; drittens aus Sulfiden und aus Thiosulfaten, indem die Thiosulfate vorher in Schwefel und Sulfid zerlegt werden, viertens durch Sulfatreduktion.

Die beiden ersten Entstehungsweisen, aus Eiweiss und Schwefel, können sowohl unter Einfluss von Mikrobien wie ohne deren Vermittlung stattfinden. Aus Thiosulfaten wohl ebenfalls, doch ist hier der Chemismus, soviel ich weiss, noch wenig untersucht. Dagegen tritt die Sulfatreduktion unter den Bedingungen der bakteriologischen Versuche nur als biologische Erscheinung hervor.

In Bezug auf die Schwefelwasserstoffbildung direkt aus Proteïnkörpern sei daran erinnert, dass aus Eieralbumin einfach durch Kochen sich 0,1 Proz. Schwefelwasserstoff entwickelt, und dass die Würze der Brauereien und Presshefefabriken beim vollständigen Ausschluss von Mikroorganismen dennoch beim Kochen neben einer geringen Kohlensäuremenge auch flüchtige Sulfide abgiebt [1]).

Der Uebergang von Schwefel durch den Kontakt mit gewissen, leicht zersetzlichen organischen Körpern in Schefelwasserstoff war schon mehrfach Gegenstand der Forschung [2]). Blut, Eiweiss, Eidotter und Hefeextrakt seien in dieser Beziehung besonders genannt, ebenso die Säfte verschiedener thierischer Organe. Ob hierbei immer genügend Unterschied gemacht ist zwischen dem sich aus dem Schwefel und dem sich schon aus den verwendeten organischen Stoffen entwickelnden Schwefelwasserstoff, ist zweifelhaft. Boehm giebt an [3]), dass Quellenwasser mit Schwefelblumen in geschlossenen Flaschen bei Luftabschluss Schwefelwasserstoff entwickelt, während reines Wasser dieses nicht thut. Für Hefeextrakt liegen Angaben vor von Rey- -Pail-

---

[1]) Zeitschr. f. Brauwesen. Bd. XVII. 1804. p. 67. Hier findet man Arbeiten von Brand und Elion referiert. Daß Mikrobien dabei bedeutungslos sind, wird im Referate zwar nicht speziell hervorgehoben, folgt aber aus dem Wortlaute, und ich kann das aus eigener Erfahrung bestätigen.

[2]) Litteratur bei Rubner, Modus der Schwefelwasserstoffbildung bei Bakterien. (Arch. f. Hygiene. Bd. XVI. 1802. p. 58 und p. 78.) Es mag auch daran erinnert werden, daß Schwefel schon einfach durch kochendes Wasser Schwefelwasserstoff entwickelt, unter gleichzeitiger Bildung von schwefeliger Säure. (Cross & Higgins, Chemical News. Vol XXXIX. 1875. p. 136.)

[3]) Monatshefte für Chemie. Bd. III. 1833. p. 224.

hade[1]), woraus erhellt, dass der schwefelwasserstofferzeugende Körper (welcher von R. Pailhade »Philothion« genannt wird) in verdünntem Alkohol löslich ist, und dass das Extrakt, ähnlich wie Würze, bei dieser Zersetzung Sauerstoff absorbiert und Kohlensäure abgiebt. Zur Herstellung des Extraktes muss Hefe zerrieben und mit kaltem Wasser extrahiert werden. Die Aktivität geht durch Kohlen verloren, beruht also wahrscheinlich auf einen koagulierbaren Proteïnkörper.

Die einfachste Weise, Schwefel in Schwefelwasserstoff überzuführen unter direktem Einfluss des Lebens, ist wohl durch Einführung von Schwefelblumen in irgend eine stark faulende Flüssigkeit oder in eine durch Alkoholhefe stark gärende Zuckerlösung. Ein Stück Bleipapier färbt sich in den Dämpfen solcher Flüssigkeiten schon in wenigen Minuten tiefbraun. Da dieses auch stattfindet in mit rein kultivierter Hefe versetzten Rohrzuckerlösungen, so ist es sicher, dass die Funktion nicht Bakterien allein, sondern auch der Hefezelle zukommt. Bezüglich des hierbei obwaltenden Chemismus besteht Unsicherheit; vielleicht handelt es sich nur um den Einfluss eines aus den Hefezellen nach aussen diffundierenden Stoffes, welcher dann identisch sein könnte mit dem aktiven Prinzip von Rey-Pailhade.

Die beiden folgenden einfachen Versuche über den biogenen Ursprung des Schwefelwasserstoffes aus Proteïnkörpern und aus regulinischem Schwefel sind für Demonstrationen geeignet.

Man fülle ein Kühne'sches Gärungskölbchen[2]) von 25 cm^3 Inhalt mit durch Kochen luftfrei gemachtem Fleischwasser und mit 0,1 Proz. Ferrolaktat oder Mohrsalz als Indikator; ein zweites ähnliches Kölbchen mit dem gleichen Gemisch, wozu noch überdies Schwefelblumen gegeben sind. Man infiziert mit einigen Tropfen Grabenwasser oder etwas Gartenerde und stellt beide in den Brütschrank bei 30° C. Sulfatreduktion findet in den genannten Flüssigkeiten nicht statt. Dennoch tritt in beiden Fällen schon nach 24 Stunden eine Schwärzung auf infolge von Schwefeleisenbildung. Es ist dabei dann bemerkenswert, dass im Kölbchen ohne Schwefel die Färbung bald eine Grenze erreicht, während sie in dem mit Schwefel versetzten Kölbchen viel länger fortschreitet und unter Absetzung von viel schwarzem Präzipitat die Flüssigkeit tief schwarz färbt.

Aus Thiosulfat lässt sich die Schwefelwasserstoffbildung leicht zeigen, wenn wachsende Hefezellen damit in Berührung sind. Ich versetze zu diesem Zwecke eine Würzegelatine mit ca. 0,1 Proz. Natriumthiosulfat ($Na^2S^2O^3 + 5H^2O$), bringe in die noch halbflüssige Masse eine Prise reiner Hefezellen und lasse nach dem Umschütteln im Kölbchen erstarren. In den Hals des Kölbchens wird ein Stück Bleipapier gehängt. Man bemerkt dann bei Zimmertemperatur nach einigen Tagen, wenn die Hefe kräftig zu wachsen beginnt, eine intensive Schwefelbleibildung.

Das Reduktionsvermögen der Hefe in Bezug auf Thiosulfat lässt sich auch sehr leicht in den Gärungen nachweisen. Lässt man z. B. eine 20-proz. Rohrzuckerlösung in Leitungswasser mit 15 Proz. frischer Presshefe vergären, so wird man, wenn einer solchen Lösung $^1/_{20}$ Proz. Natriumthiosulfat zugesetzt wird, eine vollständige Zerlegung dieses Salzes unter Schwefelwasserstoffbildung nachweisen können.

[1]) Comptes rendus, 1888, 11. Juni und 2. Juli, 18. Febr. 1889 und 22. Juni 1894.

[2]) T. Smith, The fermentation tube with special reference to anaerobiosis and gasproduction among Bacteria. (Reprint from the Wilder Quarter-Century Book, p. 187. Ithaca 1893.)

Auch Sulfite werden unter den gleichen Verhältnisen zersetzt unter Abspaltung von H^2S. So konnte ich $^1/_{15}$ Proz. Natriumsulfit ($Na^2SO^3+7H^2O$) unter gleichen Bedingungen, wie beim Thiosulfat genannt, zum Verschwinden bringen und fand dafür nahezu die äquivalente Quantität H^2S zurück. Diese Vorgänge sind bemerkenswert, weil Nitrate, Nitrite, Indigkarmin und Lakmus durch Hefe nicht reduziert werden [1].

Auch Holschewnikoff's Bacterium sulfureum zerlegt Natriumthiosulfat unter H^2S-Bildung [2].

Hier mag ebenfalls ein wenig bekannter Versuch von Zelinsky angeführt werden [3].

Dieser Forscher beschreibt unter dem Namen Bacterium hydrosulfureum eine Mikrobie, welche aus folgendem Gemische Schwefelwasserstoff entwickelt: 1 Proz. Ammontartrat, 1 Proz. Traubenzucker, $^1/_3$ Proz. Natriumthiosulfat, 0,1 Proz. Kaliumphosphat und Spuren von Calciumchlorid. Im Referate wird ohne näheren Beleg auch noch angegeben, dass das Bakterium Sulfide und Sulfate zerlegen kann, und dass sowohl Aërobiose wie Anaërobiose dabei stattfindet. Eine bestimmte Angabe, aus welcher, bei Abwesenheit anderer Schwefelquellen, das quantitative Verschwinden einer bekannten Sulfid- oder Sulfatmenge und daraus das Hervortreten von Schwefelwasserstoff erhellt, wird im Referate nicht gegeben. In dieser letzteren Beziehung sind die anderen mir bekannten älteren Arbeiten über Schwefelwasserstoffbildung aus Sulfaten auch nicht genügend beweiskräftig [4].

Eben dieser Umstand veranlasste mich, die wichtigsten biogenen Bildungsweisen der Sulfide im allgemeinen hier kurz zu betrachten, denn bei den Versuchen über Sulfatreduktion, wobei es sich um den Nachweis von Sulfiden handelt, das ist von Körpern, wovon die geringsten Spuren schon sehr kräftig reagieren, muss man sich immer bewusst sein, aus welchen anderen Quellen als Sulfaten die etwa gefundenen Sulfide wohl herrühren können.

3. Zur Theorie der biogenen Schwefelwasserstoffbildung.

Die theoretischen Betrachtungen einiger Autoren über die chemische Ursache der Schwefelwasserstoffbildung durch Mikroorganismen sind einerseits durch die Vielheit der hierbei in Betracht kommenden Umstände, andererseits durch die Unbe-

---

[1]) Andererseits werden Jodate durch Hefe reduziert unter Jodidbildung.

[2]) Fortschritte der Medizin. 1889. No. 6. (Citiert nach Baumgarten's Jahresbericht. Bd. V. 1889. p. 450.)

[3]) P. und C. G. Frankland, Microorganismus in water. 1894. p. 458. Hier findet man ein Referat von Prinz Krapotkin von einer russischen Abhandlung: »Zelinsky, Ueber Schwefelwasserstoffgärung im Schwarzen Meere und den ‚Limans von Odessa' aus Fortschr. d. russisch. chem. u. physikal. Gesellsch. Vol. XXV. 1893. Heft 5.« Die Bakterien wurden im Schlamme des Schwarzen Meeres gefunden bei Gelegenheit der »Zaphorozhets«-Expedition.

[4]) Cohn, Archiv f. Mikrosk. Anatomie. Bd. III. 1867. p. 54. Loth. Meyer, Journal. f. prakt. Chemie. Bd. XCI. p. 5. 184. Plauchud, Réduction des sulfates par les sulfuraires. (Compt. rendus. 20. Jan. 1877, 26. Dez. 1882.) Étard et Olivier, Réduction des sulfates par les êtres vivants. (Compt. rendus. T. XCV. 1882. p. 846.) Olivier, Glarine et Barégine. (Compt. rendus. T. CVI. 1888. p. 1744, 1806.) Winogradsky, Botan. Zeitung 1887. p. 400.

kanntheit, worin man bisher bezüglich des Hauptagens der Sulfatreduktion in unseren Gewässern war, nicht sehr wichtig.

Inzwischen dürften hier doch ein paar dieser Ansichten, welche von angesehenen Forschern herrühren, kurz erwähnt werden.

Mehrfach wurde die Hypothese ausgesprochen, der Vorgang beruhe auf der Wirkung von Wasserstoff im status nascens, welcher durch die Mikrobien gebildet werden soll. Zur Erhärtung dieser Ansicht geben Petri und Maassen an[1]), dass mit Wasserstoff beladenes Palladiummohr, aus in Wasser frei verteilten Schwefelblumen, sowie aus Lösungen von Thiosulfat, Eiweiss und Pepton bei 50° C Schwefelwasserstoff erzeugt, wenn man nur durch einen Wasserstoffstrom dafür sorgt, dass die Luft nicht zutreten kann. Ferner erwähnen diese Autoren auf p. 352 ihrer Abhandlung, dass Ammonsulfat Schwefelwasserstoff abgiebt durch Einwirkung von aus Zink mit Salzsäure erzeugtem Wasserstoff. Als ich jedoch mit reinem, schwefelfreien Zink in einer luftfreien 5-proz. Ammonsulfatlösung diesen Versuch zu wiederholen suchte, konnte ich keinen Schwefelwasserstoff anzeigen, und in noch verdünnteren Lösungen ebensowenig. Ich muss deshalb glauben, dass die genannten Forscher sehr konzentriertes Ammonsulfat und ebenfalls sehr konzentrierte Salzsäure für ihren Versuch verwendet haben (indem ich natürlich voraussetze, dass ihnen schwefelfreies Zink vorlag), wobei dann ebenfalls eine konzentrierte Schwefelsäure entstehen musste, welche leicht schwefelige Säure abgiebt, woraus mit Wasserstoff Schwefelwasserstoff entsteht; diese Reaktion ist aber sehr verschieden von den biologischen Vorgängen, worum es sich hier handelt.

Dass durch solche Analogieen der Chemismus der physiologischen Reduktion wirklich verständlicher werden sollte, vermag ich nicht recht einzusehen. Hierzu wäre es, um bei der Wasserstoffhypothese zu bleiben, dann doch notwendig, in den reduzierenden Zellen die Gegenwart des Wasserstoffs nachzuweisen, und nun steht es fest, dass bei dem von mir entdeckten Sulfidfermente kein Schatten von Wasserstoffbildung zu bemerken ist, und dasselbe gilt bezüglich der früher genannten Reduktionsvorgänge durch Hefe, worin noch von keinem Forscher die Gegenwart von Wasserstoff nachgewiesen ist[2]). Andererseits ergeben meine Versuche, dass in denjenigen Fällen, wo Wasserstoff faktisch entsteht, wie bei den Bakterien der Coli-Gruppe, und bei den anaëroben Granulobakterarten, welche, wie das Butylferment (Gr. butylicum) und die Buttersäurefermente (G. saccharobutyricum und G. lactobutyricum), massenhaft Wasserstoff produzieren und überdies Indigkarmin und Lakmus schnell reduzieren, das Vermögen, aus Sulfaten Schwefelwasserstoff zu bilden, fehlt.

Hoppe-Seyler hat versucht, den Vorgang in Zusammenhang zu bringen mit der Methangärung der Cellulose, welche bei Gegenwart von Gips und Eisenoxyd einen anderen Verlauf nimmt, wie bei Abwesenheit dieser Körper, und nur mit deren Mithilfe Schwefeleisen und Calciumkarbonat erzeugt. Hoppe-Seyler kann darum die Sulfatreduktion nicht als einen »selbständigen Prozess, der durch niedere Organismen

[1]) Beitr. z. Biologie der krankheitserregenden Bakterien, insbesondere über die Bildung von Schwefelwasserstoff durch dieselben unter vornehmlicher Berücksichtigung des Schweinerotlaufes. (Arb. des Kaiserl. Gesundheitsamtes. Bd. VIII. 1893. p. 350.)

[2]) Wasserstoffionen werden sich allerdings wohl in den Hefezellen vorfinden, wären diese aber die Ursache der Reduktionsvorgänge, so müßte jede Säure ein Reduktionsmittel sein.

ausgeführt wird« [1]), betrachten. Inzwischen erweist er nicht überzeugend, dass bei seinem Versuche nicht mehrere biologische Prozesse neben einander verlaufen sind. Nach meiner Ansicht ist das aber ganz sicher der Fall gewesen, und die folgenden Zeilen werden dafür den Beweis beibringen; denn es wird sich ergeben, dass die Reduktion des Calciumsulfates mit Bildung von Schwefelwasserstoff durch wenigstens einen spezifischen Erreger besorgt wird, der jedenfalls nicht direkt mit der Methanbildung zusammenhängt und Cellulose nicht angreift. Auch ist die Gegenwart von Eisensalzen für die Reduktion der Sulfate durchaus nicht notwendig. Bei Hoppe-Seyler's Versuch verschwindet Filtrierpapier unter Einfluss von Kloakenschlamm, und an seine Stelle tritt Methan mit Kohlensäure in die Erscheinung. Wenn nun angenommen wird, und es scheint mir kaum möglich, etwas Anderes anzunehmen, dass das Filtrierpapier vor der Verdrängung in der Flüssigkeit gelöst vorkomme, dann ist es jedenfalls sehr begreiflich, dass auch noch andere Mikroorganismen, wie das übrigens noch problematische Methanferment, sich damit ernähren können.

Es wird dadurch dann erklärlich, warum das Verhältnis zwischen Kohlensäure und Methan, welches unter den normalen Versuchsbedingungen wie 1 : 10 war, durch Zusatz von Gips (und Eisenoxyd), wodurch das Leben des Sulfidbildners, sowie zahlreicher anderer Mikrobien infolge der Schwefelwasserstoffbildung gefördert oder ermöglicht wurde, in 10 : 1 übergehen konnte. Allerdings erfordert diese Erklärung die Gegenwart eines Celluloseenzyms in der Methangärung, während ein solches Enzym bisher noch ebensowenig entdeckt ist, wie das Methanferment selbst. Auch bei diesem Erklärungsversuche stösst man also auf Unsicherheiten, und es scheint mir auch eigentlich noch verfrüht, eine tiefere Theorie zur Begründung eines Vorganges aufzustellen, wovon die näher liegenden Ursachen noch so wenig bekannt, dass die relativ rohe Entdeckung des Sulfidfermentes erst jetzt gelungen ist.

In Bezug auf die direkte Verwandlung des regulinischen Schwefels in Sulfide bemerkte ich schon in § 1, dass dieser Vorgang, nach meiner Ansicht, wahrscheinlich mit der Alkalibildung, welche so allgemeinen im Bakterienkörper stattfindet, zusammenhängt.

4. Zur quantitativen Bestimmung der Produkte der Sulfatreduktion.

Für unseren Zweck ist zu empfehlen, den bei der Reduktion entstehenden Schwefelwasserstoff jodometrisch zu bestimmen. Wenn auch ein Teil des Reduktionsproduktes als Sulfür (z. B. als CaS, FeS oder $(NH^4)^2S$) oder als Sulfydrat (NH^4HS oder NaHS) gegenwärtig ist, muss daraus doch in sauerer Lösung, worin die Bestimmung stattfindet, Schwefelwasserstoff entstehen, so dass die Gegenwart solcher Körper die Berechnung nicht stört, und einen Schluss gestattet auf die Quantität der durch Reduktion verschwundenen Schwefelsäure.

Inzwischen finde ich bei meinen Versuchen immer viel weniger Schwefewasserstoff als theoretisch für das verschwundene Sulfat, wenn dieses ganz in Sulfid übergeführt wäre, gefordert wird. Die Abweichungen sind sehr gross, nur $^1/_2$, $^2/_3$ und im günstigsten Falle $^3/_4$ des verschwundenen Sulfates konnten als Schwefelwasserstoff titriert werden. Es ist deshalb nötig, zu erwägen, wo der Rest des Schwefels gesucht werden muss.

[1]) Ueber die Zersetzung der Cellulose mit Bildung von Methan. (Zeitschr. f. physiolog. Chemie. Bd. X. 1886. p. 432.)

Es dürfte hierbei besonders an drei Hauptquellen eines »Schwefelverlustes« gedacht werden, nämlich die Abscheidung von regulinischem Schwefel aus den Sulfiden, die Bindung von Schwefel als Sulfit oder Thiosulfat und die Bindung des Schwefels beim Aufbau der organischen Bakteriensubstanz [1]).

Betrachten wir jeden der genannten Faktoren etwas näher.

Da es bei der bakteriologischen Untersuchung der Sulfatreduktion nötig ist, einen empfindlichen Indikator zu verwenden, ist dabei der Gebrauch von Ferro- oder Ferrisalzen sehr zu empfehlen. Für die quantitative Untersuchung entsteht dadurch jedoch eine Unsicherheit, da eben die Eisensalze sehr leicht zu Schwefelabtrennung veranlassen. Für die Ferrisalze gilt dieses selbst bei vollständigem Luftabschlusse [2]); für Ferrosalze bei Luftzutritt [3]). Hierbei muss ebenfalls wohl bedacht werden, dass Schwefelwasserstoff bei Luftzutritt an sich leicht zu Schwefel und Wasser oxydiert und dass dieses auch teilweise stattfindet beim Schwefeleisen [4]).

Bei der quantitativen Bestimmung muss nun zwar jedenfalls bei Luftabschluss experimentiert werden. Da jedoch Schwefel, welcher beim bakteriologischen Versuche durch irgend eine Ursache einmal abgeschieden ist, nur langsam in Sulfid zurückkehrt, und bei jeder Titrierung beinahe unvermeidlich etwas Luft zutritt, wodurch eine kleine Menge Schwefel im Kulturgefässe entsteht, welche bei einer folgenden Titrierung noch nicht verschwunden ist, so sieht man, dass mehrere Ursachen vorliegen, wodurch infolge von Schwefelbildung eine genaue Uebereinstimmung zwischen reduziertem Sulfat und gefundenem Schwefelwasserstoffe nicht zu erwarten ist. Bei meinen Versuchen habe ich, wie gesagt, im günstigsten Falle ca. $^3/_4$ des verschwundenen SO^3 als H^2S titrieren können, meistens kam ich nur auf $^2/_3$ und oft selbst nur auf $^1/_2$ der Totalmenge. Da im allgemeinen die Versuche ein desto höheres Schwefelwasserstoff ergeben, je grösser die verwendeten zu reduzierenden Flüssigkeitsmassen sind, ist es deutlich, dass dabei die Luft oder das Eisenoxyd wohl infolge der Schwefelabscheidung eine beträchtliche Rolle mitspielen, doch glaube ich, dass daraus zugleich hervorgeht, dass die Abweichung so gross ist, dass sie nicht allein durch Schwefelabtrennung (oder Sulfatrückbildung während des Versuches) erklärt werden kann, sondern dass auch die anderen beiden Verlustquellen mitwirken müssen.

Die Bindung eines Teiles des Schwefels beim Aufbau des Bakterienkörpers wird dann wichtig werden, wenn sehr viel organische Stoffe in der ursprünglichen Lösung vorkommen, so dass auch viel organisiertes Material entstehen muss. Da die Reduktionsversuche jedoch in beinahe ganz klaren Flüssigkeiten verlaufen können, woraus hervorgeht, dass die Masse des Sulfidfermentes, welches sehr aktiv ist, nur verschwindend klein zu sein braucht, selbst um sehr beträchtliche Sulfatmengen zu reduzieren, so ist es klar, dass in der Schwefelbildung als organisierte Substanz jedenfalls nicht immer eine beträchtliche Quelle des Schwefeldefizits gelegen sein kann.

---

[1]) Ich glaube nicht, daß bei meinem Versuchsverfahren an die Entstehung von Polysulfüren gedacht werden kann.

[2]) $Fe^2(OH)^6 + 3H^2S = 2FeS + S + 6H^2O$

$Fe^2Cl^6 + 3(NH^4)^2S = 2FeS + S + 6NH^4Cl$

[3]) $2FeS + 3O = Fe^2O^3 + 2S$.

[4]) $FeS + 4O = Fe^2SO^4$; hierbei entstehen zugleich Ferriverbindungen und findet wieder Schwefelabtrennung statt.

Eine sehr beträchtliche Fehlerquelle muss dagegen entstehen, wenn Sulfite gegenwärtig sind und die Flüssigkeit angesäuert wird. Denn wenn auch Sulfite in neutraler Lösung sich bei der Jodmethode quantitativ wie Schwefelwasserstoff betragen, so ist dies durchaus nicht mehr der Fall bei Gegenwart einer Säure, wodurch schwefelige Säure entsteht, welche unter Schwefelbildung einen Teil des Schwefelwasserstoffes zerlegt und so zu einer doppelten Fehlerquelle veranlasst.

Wenn man ferner überlegt, dass das bei der Dosierung verwendete Jod viermal mehr reduzierte Schwefelsäure anzeigt, wenn diese als Thiosulfat titriert wird, wie wenn als Schwefelwasserstoff bestimmt [1]), so sieht man, dass eine geringe Menge Thiosulfat ebenfalls einen sehr merklichen Effekt auf die Rechnung ausüben muss. Da ich auf Grund des Verhaltens meiner reduzierten Lösungen Silber-, Eisen- und Zinksalzen gegenüber wirklich auf Sulfit- oder Thiosulfatgegenwart glaube schliessen zu müssen, wenn es auch noch nicht gelang, diese Körper als solche abzuscheiden, so scheint mir, dass hier eine weitere Untersuchung mit Aussicht auf Erfolg wird einsetzen können [2]).

Kurz, ich glaube, dass die Bildung von Thiosulfaten oder Sulfiten neben derjenigen von Sulfiden bei der Sulfatreduktion stattfinden muss. Da jene Körper aber, wie wir gesehen haben, an sich sehr leicht reduzierbar sind, muss es möglich sein, dieselben doch schliesslich wieder in Sulfide zu verwandeln.

Wenn aus dem Vorhergehenden erhellt, dass eine quantitative Schwefelsäurebestimmung in Wasser vermittelst des Reduktionsverfahrens noch nicht gefunden ist, so ergiebt sich daraus zu gleicher Zeit, dass weitere Versuche in dieser Richtung nicht aussichtslos sind, was besonders deshalb betont werden mag, weil die Reduktionsversuche an sich ausserordentlich einfach eingerichtet werden können. Es würde zur Erreichung jenes Zieles nur nötig sein, dem Reduktionsprozesse einen konstanten Verlauf zu geben, was wohl vielleicht durch Zusatz bestimmter anorganischer Salze, wie Kochsalz, gelingen dürfte.

Was nun die praktische Ausführung der Bestimmungen betrifft, so mag hier folgendes hervorgehoben werden.

Der ganze Reduktionsversuch muss, wie gesagt, bei Sauerstoffabschluss stattfinden. Da es erwünscht ist, mit grossen Flüssigkeitsmengen zu experimentieren, verwende ich Glasflaschen von 2 l Inhalt oder (weissglasige) gewöhnliche Flaschen mit »Bierverschluss«, welche bis zum Stöpsel anzufüllen und luftdicht zu verschliessen sind. Anfangs arbeitete ich mit der bekannten, aus einem Stücke geblasenen Gaswaschflasche, wobei ich beim Titrieren leicht durch Wasserstoffdruck eine bestimmte Zahl von cm^3 in die titrierte Jodlösung überführen konnte. Doch bin ich später zu

[1]) Dieses geht hervor aus den Formeln $H^2S + 2J = 2HJ + S$ und $2(S^2O^3Na^2) + 2J = 2NaJ + S^4O^6Na^2$, woraus sich ergiebt, daß 1 cm^3 Normaljodlösung (127 mg) mit 40 mg SO^3 korrespondiert, wenn dieses in Schwefelwasserstoff, dagegen mit 160 mg SO^3, wenn dieses in Thiosulfat übergegangen ist.

[2]) Grabenwasser an sich absorbiert zwar etwas Jod (destilliertes und Leitungswasser thun dieses ebenfalls), doch hat sich durch Titrierung mit tausendstel Normaljodlösung herausgestellt, daß der Betrag so klein ist, daß ich bei meinen Versuchen damit nicht zu rechnen hatte. Ich will hier noch schließlich bemerken, daß ich mit Hilfe von Kaliumjodat zwar vergebens nach Sulfiten gesucht habe, doch läßt diese Reaktion an Sicherheit zu wünschen übrig, wenn sie in so komplizierter Lösung, wie die uns hier beschäftigende, verwendet wird.

den gewöhnlichen Stöpselflaschen gekommen, womit sich für unseren Zweck genau genug arbeiten lässt. Auch habe ich viele Versuche in grossen Standgläsern von vier und mehr Litern Inhalt, welche einfach gänzlich mit der zu reduzierenden Flüssigkeit angefüllt und vermittelst einer auf dem Wasser und dem Rande liegenden Glasplatte abgeschlossen waren, mit bestem Erfolge ausgeführt. Der gelöste Sauerstoff wird bald durch die saprophyten Bakterien absorbiert und wenn der organische Stoff nahezu verschwunden und dabei das Medium sauerstofffrei geworden ist, fängt das Sulfidferment sich zu vermehren und zu reduzieren an. Ist noch viel organische Substanz nach dem Verbrauch des Sauerstoffes vorhanden, so kann eine Lüftung notwendig werden, ohne welche Reduktion überhaupt nicht eintreffen würde, weil dem Sulfidfermente schädliche organische Körper vorher durch die anderen Bakterien zerlegt werden müssen. Die Kunst der Reduktionsversuche besteht darin, die Menge der zugesetzten Nahrung eben zureichend zu machen zur Erlangung und Erhaltung der Anaërobiosis des Sulfidfermentes bei Gegenwart einer sehr verschiedenartigen Flora und Fauna von Nebenfermenten.

Nachdem das niemals fehlende Präzipitat gut durch Schütteln in der Flüssigkeit verteilt ist, wird je nach Umständen 10, 25, 50 cm³ vermittelst einer Stielpipette aus der Tiefe gesaugt und die Flasche wieder mit der ursprünglichen Flüssigkeit gänzlich angefüllt, verschlossen und zu weiterer Reduktion im Brutschranke gelassen. Der Inhalt der Pipette wird in einer bestimmten, dem Schwefelwasserstoff mehr als entsprechenden Menge (durch einen Vorversuch ist festgestellt, wie viel Jod ungefähr notwendig ist) der hundertstel normalen Jodlösung gegeben [1]), welche mit Salzsäure angesäuert ist, damit etwa vorhandene Sulfide ihren Schwefel als Schwefelwasserstoff entbinden. Die Trübung, welche dabei entsteht, rührt von freiem Schwefel her, welcher sich unter der Einwirkung des Jods bildet. Lässt Salzsäure an sich, nach der Lösung der Hauptmasse des Präzipitates, eine bleibende Trübung zurück, so rührt diese von auf andere Weise gebildeten freiem Schwefel her und bezeichnet eine der oben besprochenen Verlustquellen. Das Uebermass der verwendeten Jodlösung wird mit hundertstel normaler Thiosulfatlösung [2]) zurücktitriert und diese Zahl von der ursprünglich verwendeten Menge abgezogen und in cm³ Normaljod pro Liter der Versuchsflüssigkeit ausgedrückt; die reduzierte Schwefelsäure wird dann sofort bekannt, da 1 cm³ Normaljodlösung 17 mg Schwefelwasserstoff und 40 mg SO^3 entspricht, wenn bezüglich der Reduktion vorausgesetzt wird, dass nur Schwefelwasserstoff aus der verschwundenen Schwefelsäure entstanden ist.

5. Sulfatreduktion in Wasser und in Nährflüssigkeiten durch die Rohkultur des Sulfidfermentes [3]).

Es ist nicht schwierig in Wasser oder in verdünnten, nicht sterilisierten Nährlösungen eine vollständige Sulfatreduktion herbeizuführen. In der Natur, z. B. in dem

[1]) Diese Lösung wird hergestellt durch ca. 1,27 g Jod. in einigen cm³ einer konzentrierten Jodkaliumlösung aufzulösen und dann so mit Wasser zu verdünnen, daß genau 1,27 g Jod auf einen Liter Flüssigkeit kommt.

[2]) Diese Lösung enthält 2,48 g Thiosulfat ($Na^2S^2O^3 + 5H^2O$) pro Liter.

[3]) Unter »Rohkultur des Sulfidfermentes« verstehe ich das Bakteriengemisch, wie es in den natürlichen Gewässern angetroffen wird, worin jedoch dem Sulfidfermente die notwendigen Bedingungen zu seiner Entwicklung erfolgreich dargeboten sind.

Stadtgraben, findet der Vorgang, wenn auch nicht bis zum völligen Schwinden der Sulfate, im Sommer, bei starker Verunreinigung des Wassers durch Spülwasser bekanntlich sehr ausgiebig statt, wobei als Endprodukt Schwefelwasserstoff entsteht. In manchen holländischen Städten handelt es sich hierbei um einen wahren Schrecken und allein umfassende und kostspielige Wasserwerke sind imstande, darin Verbesserung zu bringen. Sobald der Reduktionsvorgang allgemein wird, sinkt der Sauerstoffgehalt des Wassers auf Null, oder vielleicht besser gesagt, sobald das Bakterienleben durch den Gehalt des Wassers an organischen Stoffen den Sauerstoffgehalt des Wassers auf Null bringt, fängt die Sulfatreduktion im Grossen an. Dass damit ein allgemeines Absterben der Fische einhergeht[1]), ist leicht begreiflich, und auch in der mikroskopischen Fauna findet zu solchen Zeiten eine tiefgreifende Umwandlung statt. Besonders gewisse Infusorienarten vermehren sich dann ausserordentlich, so dass ein dahingestelltes Glas Grabenwasser sich an der Oberfläche bald mit einer geschlossenen Schicht dieser Sauerstoff bedürftigen Tiere bedeckt[2]).

Was die Natur nun bisweilen in grossem Massstabe zu sehen giebt, kann im Laboratorium sehr leicht und rasch im Kleinen nachgeahmt werden, und zwar durch sehr lehrreiche Versuche, welche wie folgt anzustellen sind:

Besonders in den Monaten Juli, August und September ist das Grabenwasser sehr reich an Sulfidfermenten, später im Jahre wird es daran ärmer oder selbst ganz frei davon. Im Grabenschlamme fehlen die Sulfidbakterien nach meiner Erfahrung dagegen nimmer, so dass nicht zu kleine Prisen schwarzen Schlammes unserer Binnenwässer ein unfehlbares Infektionsmaterial für die Einleitung der Reduktionsversuche sind. In Gartenerde konnten Sulfidfermente auf einer Tiefe von 5 cm angezeigt werden, grössere Tiefen untersuchte ich nicht. Wahrscheinlich kommen sie aber auch tiefer im Boden vor.

In den genannten Monaten braucht man dem Wasser oft nur eine sehr geringe Menge organischer Stoffe hinzuzufügen, um vollständige Sulfatreduktionen hervorzurufen, und zwar im Verlaufe von 12—24 Stunden bei 25—30° C. Hierbei müssen besonders die drei folgenden Umstände beachtet werden: Der Sauerstoffzutritt muss ausgeschlossen sein; — die organischen Körper dürfen zu keiner Säurebildung Veranlassung geben, daher müssen Zuckerarten entweder ferngehalten oder nur in so kleinen Quantitäten zugesetzt werden, dass die Wasserbakterien schnell die Zersetzung zu Kohlensäure und Wasser herbeiführen; — Phosphate und andere salzige Körper müssen vorhanden sein; — Stickstoffverbindungen brauchen nur dann zugesetzt zu werden, wenn es sich um die Reduktion von mehr als 60 mg SO^3 pro Liter Wasser handelt, anderenfalls enthält Leitungs- und Grabenwasser genug natürliche Stickstoffverbindungen, um das Bedürfnis der Sulfidmikrobien zu decken. Hierbei muss noch speziell bemerkt werden, dass destilliertes Wasser bei jeder bisher zur Verwendung gekommenen Zufügung sich immer als viel weniger gut für Sulfatreduktionen gezeigt hat, wie rohes Wasser, auch nach dem Kochen des letzteren. Beim Anfange

[1]) Das Volk sagt in solchen Fällen: »das Wasser ist schlecht«. Durch zahlreiche Sauerstoffbestimmungen nach Winkler's Methode (Ber. der deutsch. chem. Ges. Jahrg. XXI 1888. p. 2843) habe ich die hier ausgesprochene Ansicht gewonnen.

[2]) Die in solchem Wasser massenhaft vorkommenden Infusorien suchen nicht die höchste, sondern eine bestimmte niedrige Konzentration des gelösten Sauerstoffes, sie gehören in dieser Beziehung also zum »Spirillentypus«

der Versuche, wenn es sich darum handelt, ein an Sulfidfermenten reiches Infektionsmaterial zu bekommen, ist man immerhin auf gewöhnliches rohes Grabenwasser angewiesen, da das Ferment ausserhalb desselben jedenfalls viel seltener ist. Niemals brachten die Wände der Gefässe, oder der Staub der Tische, oder die Luft Sulfidbakterien an [1]).

Die Sulfatreduktion findet am besten statt in sehr verdünnten Nährlösungen. Da das Sulfidferment Gelatine nicht verflüssigt und keine Säure erzeugt, welche Agar vielleicht angreifen könnte, sind sowohl Gelatine wie Agar in den festen Nährböden an sich nicht schädlich für die Reduktion. Uebrigens ist das Ferment auch nicht in dem Masse empfindlich für gelöste organische Körper, wie das Nitritferment der Ammonsalze, welches zwar bei Gegenwart von lange in destilliertem Wasser ausgewaschenem Agar kräftig nitrifiziert; dieses jedoch auf Gelatine, auch wenn diese mit grösster Sorgfalt von den löslichen organischen Körpern gereinigt ist, nur ganz schwach und auch nur sehr kurz thut [2]). Für das Sulfidferment ist bemerkenswert, dass die Endprodukte des Bakterienlebens dafür nicht nur nicht schädlich sind, sondern eben die Entwicklung desselben begünstigen, worauf vielleicht der früher genannte günstige Einfluss des Grabenwassers beruht. Jedenfalls gelingen die Kulturen des Fermentes bei Gegenwart anderer Bakterien viel besser, wie in den Reinkulturen.

In Uebereinstimmung mit letzteren Bemerkungen können Flüssigkeiten, worin ein kräftiger Reduktionsvorgang stattfindet, sehr klar aussehen. Nur zu Boden derselben liegt der anorganische Schlamm, welcher unter dem Einflusse des Natriumkarbonates entstanden ist. Dieser Schlamm darf niemals fehlen und bildet die Lagerstätte, worin die Sulfidfermente sich leicht ein zusprechendes anaërobies Medium schaffen können. Bei meinen Versuchen besteht der Schlamm hauptsächlich aus Calciumphosphat und -Karbonat mit aus dem Grabenwasser stammenden organischen Teilchen. Auch Eisenphosphat und -karbonat sind sehr geeignet, dem Fermente als Substrat zu dienen. In eisenhaltigem Schlamme sieht man die sich durch Schwärzung anzeigende Reduktion oft von einem kleinen engumschriebenen Flecken ausgehen, welcher sich allmählich ausdehnt, bis schliesslich die ganze Schlammschicht tief schwarz ist. Es ist dieses besonders deshalb bemerkenswert, weil das Sulfidferment in schnell beweglichem Zustande vorkommen kann, so dass geschlossen werden muss, dass diese Beweglichkeit nur ausnahmsweise eintritt. Doch habe ich gefunden, dass es eine ziemlich allgemeine Regel ist, dass bewegliche Bakterien, unter guten Ernährungsbedingungen, in vollständiger Ruhe sind.

Die Anhäufung des Sulfidfermentes in einem anorganischen Schlamme erinnert lebhaft an das analoge Verhalten bei der Nitrifikation, doch existiert hier der grosse Unterschied, dass der Kreideschlamm, worin sich das Nitritferment ansiedelt, sauerstoffgesättigt sein muss, während das Sulfidferment vollständige Abwesenheit des Sauerstoffes erfordert.

Die Herstellung von Flüssigkeiten, worin bestimmte Sulfatmengen zum vollständigen Schwinden gebracht werden konnten unter Bildung von Schwefelwasserstoff, ist mir auf sehr verschiedene Weise gelungen. Das einfachste Rezept, welches zwar nicht immer, jedoch gewöhnlich zum Ziele führt, ist wohl folgendes:

---

[1]) Das Sulfidferment stirbt also wahrscheinlich beim Trocknen

[2]) Eine deutliche Verflüssigung der Gelatine findet durch das Nitritferment der Ammonsalze nicht statt.

Zu 1 l Grabenwasser setzt man 3 cm³ einer Malzwürze von ca. 10° Balling, 1 g krystallisiertes Natriumkarbonat ($Na^2CO^3 + 10\,H^2O$) und 0,2 g Mohrsalz ($FeSO^4 + (NH^4)^2SO^4 + 6H^2O$). Es entsteht ein sich langsam absetzendes Präzipitat von Calcium- und Ferrophosphat und -karbonat. Ist der Schwefelsäuregehalt des Grabenwassers 40 mg pro Liter, so enthält die Lösung $40 + 81{,}6 = 121{,}6$ mg, wovon durch die 28 mg hinzugesetztes Eisen 66 mg als Schwefeleisen gebunden werden können, während 55,6 mg als Calciumsulfid oder auf andere Weise in die Erscheinung treten werden, sobald die Reduktion vollständig ist. Man schüttelt tüchtig, so dass der Niederschlag sich gleichmässig verteilt, und füllt nun mit der fertigen Masse eine Flasche gänzlich bis zum Stöpsel oder einfach ein grosses Becherglas, welches derweise mit einer ebenen Glasplatte abgeschlossen wird, dass keine grossen Luftblasen hängen bleiben. Man stellt nun in den Brutschrank, und zwar bei einer Temperatur, welche 25—30° C nicht überschreiten soll. Zwar kann die Reduktion auch bei höheren Temperaturen und noch bis ca. 40° C stattfinden, doch liegt das Optimum des Reduktionsvorganges nicht weit von 25° C und eher darunter. In denjenigen Fällen, wobei man mit höheren Temperaturen wie 25—30° C besser auskommt, muss die Ursache gesucht werden in der Natur der neben dem Sulfidfermente vorkommenden anderweitigen Bakterienarten, welche besonders durch ihr Sauerstoffbedürfnis und unter Umständen durch Alkali- oder Säurebildung einen erheblichen Einfluss auf den Reduktionsvorgang ausüben. Was die untere Grenze der Reduktionstemperatur betrifft, so finde ich, dass, wenigstens in den Rohkulturen, zwar bis zu 12° C Reduktion möglich ist, dass jedoch der Vorgang unterhalb 20° C so unsicher wird und so oft ganz ausbleibt, dass man besser thut, die Temperatur nicht unter 20° C sinken zu lassen.

Bei dem hier behandelten Versuche wurde mit 2 l Flüssigkeit experimentiert in einer mit Glasstöpsel verschlossenen und vollständig angefüllten Flasche. Es wurde jeden Tag 25 cm³ Flüssigkeit titriert und die Flasche wieder gänzlich angefüllt mit dem ursprünglichen Gemische.

Den Verlauf der Reduktion ersieht man aus folgender Tabelle:

Nach Tagen	Kubikcentimeter Normaljodlösung pro Liter	Entsprechender Schwefelwasserstoff mg pro Liter [1])	Entsprechende Schwefelsäure mg pro Liter [2])	Bemerkungen
2	0,75	12,75	30	
3	1,5	25,5	60	
4	1,9	32,3	76	
5	2,1	35	84	Keine Schwefelsäure mehr.
6	2,1	35	84	Spur Schwefelsäure.

Da bei diesem Versuche anfangs 121 mg SO^3 pro Liter gegenwärtig waren und hiervon 84 als Schwefelwasserstoff zurückgefunden wurden, während doch nach 5 Tagen die Flüssigkeit sich durch die Barytreaktion als vollständig frei von Schwefelsäure ergab, folgt, dass $121 - 84 = 37$ mg SO^3 auf andere Weise verschwunden sind,

[1]) Ein Kubikcentimeter Normaljodlösung entspricht 17 mg Schwefelwasserstoff

[2]) Ein Kubikcentimeter Normaljod entspricht 40 mg SO^3.

entweder also als organisch festgelegter, oder als freier Schwefel, oder als ein anderes Reduktionsprodukt [1]).

Weil nach 6 Tagen wieder eine Spur Schwefelsäure gefunden wurde, folgt, dass die 25 cm^3 frischer Versuchsflüssigkeit, welche am 5. Tage zugesetzt waren, in 24 Stunden noch nicht vollständig reduziert waren.

Bei einem anderen Versuche wurde die Versuchsflüssigkeit wie folgt hergestellt:

Grabenwasser wurde mit Gips ($CaSO^4 + 2H^2O$) gesättigt (ca. 2 g Gips lösen sich in 1 l Wasser). Die Lösung enthielt zufälligerweise genau 1000 mg SO^3 pro Liter. Pro Liter wurden zugesetzt 50 mg Natriummalat, 50 mg Asparagin, 100 mg Kaliumphosphat und 1 g Natriumkarbonat; keine Eisensalze.

Der Verlauf der Reduktion war folgender:

Nach Tagen	Kubikcentim. Normaljod pro Liter	Milligramm Schwefelwasserstoff pro Liter	Milligramm SO^3 pro Liter	Bemerkungen
6	1,5	25,5	60	
11	2	34	80	
13	2,5	42,5	100	
15	2,9	49,3	116	Etwas Schwefel abgesetzt.
16	3	51	120	
18	3,5	59,5	140	
20	3,5	59,5	140	
21	3,1	52,7	124	Luft zugetreten, Schwefel abgesetzt.

Eine gesättigte Gipslösung mit der notwendigen organischen Nahrung ergiebt sich demnach als geeignete Flüssigkeit für Reduktionsversuche. Jedoch war die Reduktion in diesem Falle langsam gegangen und von den 1000 mg SO^3 waren nur 124 reduziert. Als neue Nährflüssigkeit zugesetzt wurde, wurde aus unbekannten Gründen keine weitere Reduktion beobachtet. Dass dieses nicht in der Anhäufung des Schwefelwasserstoffes liegt, erhellt aus folgendem Versuche:

Zu Grabenwasser mit 37,5 mg SO^3 pro Liter wurden zugesetzt pro Liter 130,6 mg Mohrsalz ($FeSO^4 + (NH^4)^2SO^4 + 6\ H^2O$), enthaltend 53,3 mg SO^3, 492,6 mg $MgSO^4 + 7\ H^2O$, enthaltend 160 mg SO^3, 100 mg ClNa, 100 mg Natriummalat, 100 mg Asparagin, 200 mg Kaliumphosphat und 1 g Natriumkarbonat. Die Flüssigkeit enthielt also im ganzen $37,5 + 53,3 + 16 = 250,8$ mg SO^3 pro Liter [2]).

[1]) Mehrere auch mit ganz anderen Nährstoffen und sehr verschiedenen SO^3-Mengen ausgeführte Versuche gaben ein mit diesem so gut übereinstimmendes Resultat, daß ich anfangs glaubte, eine Methode zur quantitativen Schwefelsäurebestimmung wäre gefunden. Spätere Versuche haben aber gezeigt, daß große, noch nicht aufgeklärte Abweichungen vorkommen, so daß jede Sicherheit vorläufig fehlt.

[2]) Hier war, wie man sieht, Kochsalz zugesetzt. Neuere Versuche erweisen, daß 3 Proz. Kochsalz in meinen früher verwendeten Rohkulturen den Beginn der Reduktion durch Spirillum desulfuricans zwar verzögert, den Vorgang selbst von da an jedoch eher begünstigt wie herabsetzt.

Die sehr kräftige Reduktion verlief wie folgt:

Nach Tagen	Kubikcentim. Normaljod pro Liter	Entsprechend mg H^2S pro Liter	Entsprechend mg SO^3 pro Liter	Bemerkungen
3	1,6	27,2	64	Ganze Flüssigkeit schwarz.
4	2	34	80	Das Schwefeleisen sinkt.
5	2,3	39,1	92	Flüssigkeit klar.
6	2,8	47,6	112	
7	3,4	57,8	136	Etwas Schwefel am Glase abgesetzt.
8	3,6	61,2	144	
9	3,7	62,9	148	
15	4,1	69,7	164	**Schwefelsäure verschwunden.**
20	3	51	120	Luft zugetreten, viel Schwefel.

Von den 250,8 mg SO^3, welche ursprünglich vorhanden waren, sind 164 in Schwefelwasserstoff verwandelt und 86,8 mg auf andere Weise, offenbar teilweise als Schwefel, verschwunden.

Da ich bisher bei keinem Versuche eine stärkere Schwefelwasserstoffanhäufung erzielen konnte wie hier, dürften ca. 70 mg H^2S pro Liter die Schwefelwasserstoffgrenze sein, oberhalb welcher dieser Körper auf das Sulfidferment schädlich zu wirken anfängt. Da 1 cm^3 Schwefelwasserstoffgas 1,5 mg wiegt, entspricht diese Zahl 46 cm^3 pro Liter [1]).

Die kleine Menge Schwefelsäure, welche im Delfter Grabenwasser vorhanden ist, lässt sich übrigens leicht und schnell reduzieren, wenn man diesem Wasser irgend einen organischen Nährstoff, wie Zucker, Stärke, Glycerin, Asparagin, Lactat, Tartrat oder Pepton und etwas Kaliumphosphat, Eisenchlorid und Natriumkarbonat zusetzt. Von organischen Stoffen ergaben sich nur Natriumbutyrat, -acetat und -formiat als ungeeignet, um die Reduktion einzuleiten. Ein Beispiel:

Grabenwasser mit 45 mg SO^3 pro Liter wurde versetzt pro Liter mit 50 mg Glukose, 100 mg Kaliumphosphat, einigen Tropfen Eisenchloridlösung, 0,5 g Natriumkarbonat. Die Reduktion verlief, unter Einfluss einer Infektion mit dem Schlamme einer vorhergehenden Reduktion, wie folgt:

Nach Stunden	Kubikcentim. Normaljod pro Liter	Milligramm H^2S pro Liter	Milligramm SO^3 pro Liter	Bemerkungen
12	0,2	3,4	8	Schwarzfärbung der Flüssigkeit.
18	0,4	6,8	16	
24	0,5	8,5	20	
36	0,6	11,2	24	**Schwefelsäure verschwunden.**
48	0,5			Wieder etwas Schwefelsäure.

[1]) Herr Bakhuis Roozeboom hat mich darauf aufmerksam gemacht, daß er in einem Muster mit organischen Körpern verunreinigten Meerwassers, welches in einer geschlossenen Flasche, auf deren Boden etwas Thon lag, aufbewahrt wurde, einmal 151 mg H^2S pro Liter gefunden hat, welches durch natürliche Sulfatreduktion entstanden sein mußte.

In diesem Falle waren also von den 45 mg SO^3 als Schwefelwasserstoff, 21 auf andere Weise verschwunden.

Wenn der Glukosegehalt höher genommen wird, so muss man befürchten, dass Buttersäuregärung auftritt infolge der grossen Allgemeinheit der Granulobakterien im Grabenwasser. Als ich z. B. 100 mg Glukose oder mehr pro Liter verwendete, war das der unvermeidliche Erfolg, dadurch wird aber die Reduktion zunächst gründlich verhindert und in solcher Lösung findet dann erst nach Wochen oder Monaten die Reduktion statt, wenn die Butyrate und die massenhaft gebildete Kohlensäure verschwunden sind.

Es scheint mir nicht notwendig, noch mehr Versuche zu beschreiben. Die angeführten wurden gewählt aus einer längeren Reihe, welche während der Jahre 1893 und 1894 ausgeführt sind[1]. Ich will allein noch bemerken, dass es ganz gleichgiltig ist, welches Sulfat (natürlich nicht giftig) vorgelegt wird. Natriumsulfat, Kaliumsulfat und Alaun konnten bei genügender Verdünnung ebenso gut reduziert werden, wie Eisensulfat, Mohrsalz, Magnesiumsulfat und Gips. Offenbar handelt es sich hierbei nur um die SO^4-Gruppe, welche als Jod in der Flüssigkeit vorkommt[2].

6. Isolierung und Eigenschaften des Sulfidfermentes.

Die Isolierung des Sulfidfermentes hat mir viel Mühe gekostet. Nicht weil die Sache an sich so besonders schwierig ist, wenn man die Eigenschaften dieser Mikrobie einmal kennt, sondern weil ich ursprünglich von der unrichtigen Voraussetzung ausging, dass die gewöhnlichen reduzierenden Bakterien aus dem Wasser und der Erde auch Sulfate würden reduzieren können[3].

Als ich durch viele negative Versuche schliesslich wusste, dass die Voraussetzung nicht zutreffend war und es sich hierbei um einen speziellen Erreger handeln musste, welcher Spirillengestalt besitzt, verfiel ich in einen anderen Irrtum. Da ich in zahlreichen Kulturen, besonders in festen Substraten gesehen hatte, dass die Sulfatreduktion durch den Sauerstoff begünstigt werden kann, meinte ich, dass dieses immer so

[1] Die ursprüngliche Anleitung zu diesen Versuchen war eine rein praktische: Es handelte sich um die Herstellung eines vollständig gipsfreien Dampfkesselspeisewassers aus Grabenwasser auf ökonomischem Wege.

[2] Auf Grund der neuen Lösungstheorie wäre es deshalb auch eigentlich richtiger, in den Resultaten der Analysen nicht SO^3-, sondern SO^4-Gehalte anzugeben.

[3] Ein hübscher Versuch, um Nitrat reduzierende Bakterien aus Rohkulturen zu isolieren, ist folgender: Man versetzt die zu verwendende Nährgelatine mit 1/10 Proz. Kalisalpeter und etwas Kartoffelstärke, kocht und gießt die flüssige Masse in eine Glasdose. Nach dem Erstarren wird mit sterilisiertem Wasser, worin die bakterienhaltige Rohkultur (ein Tropfen Spüljauche, etwas Grabenwasser etc.) verteilt ist, übergossen. Man legt die Glasdose umgekehrt, wodurch alles Wasser abläuft, und läßt bei 20° C wachsen. Wenn die Kolonieen gut entwickelt sind, übergießt man die Hälfte der Platte mit verdünnter Salzsäure, worin Jodkalium gelöst ist. Alle Kolonieen, welche Salpeter reduziert haben und dadurch von einem Diffusionsfelde von Kaliumnitrit umgeben sind, werden dann das Centrum eines intensiv blauen Zirkelfeldes von Jodstärke auf farblosem Boden. Die mit Salzsäure übergossenen Bakterien sterben. Durch Vergleich sieht man aber bald auf der nicht übergossenen Hälfte, welche die reduzierenden Arten sind, und hebt diese auf für weitere Untersuchung. Die Zahl der Salpeter reduzierenden Arten ist in Grabenwasser überraschend groß.

sein müsste und dass das Sulfidferment, eben wie die übrigen mir bekannten Spirillen, für sein Wachstum zwar wenig, jedoch ein bestimmtes Mass von Sauerstoff erfordert.

Indem es mir gelang, durch das gewöhnliche Gelatineverfahren drei Varietäten kleiner Wasserspirillen, welche ich als zu Spirillum tenue Cohn gehörig erachte, aus meinen Rohreduktionen zu isolieren, vermeinte ich jedesmal das richtige Ferment gefunden zu haben, und da es mir besonders im Anfange nicht leicht war, mit Sicherheit festzustellen, ob eine bestimmte Bakterienart unter keinem Umstande Sulfate zu reduzieren vermag, waren wieder viele zeitraubende Versuche nötig, um den negativen Charakter bezüglich der Sulfatreduktion bei jenen Spirillen festzustellen. Ueberhaupt ist die Untersuchung auch noch durch andere Ursachen reich an Misserfolgen gewesen.

Ein Schritt auf den richtigen Weg war die Erkenntnis, dass der begünstigende Einfluss des Sauerstoffes auf das Sulfidferment an sich nicht besteht, sondern dass es sich dabei um eine Wachstumsförderung der nebenbei vorkommenden Bakterien handelt, welche eben durch ihre Entwicklung den Boden für das Sulfidferment besser geeignet machen.

Es wurde mir dann deutlich, dass das Ferment, obwohl ein Spirill, dennoch obligat anaërobisch sein musste und nur bei relativ geringen Mengen organischer löslicher Nährstoffe zur Entwicklung kommt, weshalb die Reduktionserscheinung besonders in alten, von Bakterien erschöpften Nährlösungen bemerkt wird.

Da das Ferment in meinen Rohkulturen, verglichen mit den gewöhnlichen Arten, immer nur in verschwindend geringen Mengen vorkommt, musste zunächst ein Mittel ausfindig gemacht werden, um die Sulfidbakterien anzuhäufen. Dieses ist gut gelungen durch die Verwendung einer kleinen Vorrichtung, welche ich Trennungskölbchen nennen will und in Fig. 1 und 2 abgebildet habe[1]). Das Kölbchen bezweckt, aus einer gewöhnlichen Kultur, welche unter beschränktem Luftzutritte stattgefunden hat, die dabei zur Entwicklung gekommenen Anaërobien von der Hauptmasse der gleichzeitig gewachsenen Aërobien zu trennen, und beruht auf dem Umstande, dass die Bakterien gewöhnlich spezifisch schwerer sind, wie ihr Nährmedium, so dass sich nicht bewegende Formen[2]) ohne äussere Veranlassung keine Neigung zeigen, in einer vertikalen Flüssigkeitssäule sich aufwärts zu bewegen, wohl dagegen sich zu senken[3]). Das Kölbchen ist eine Modifikation des gewöhnlichen Gärungskölbchens und unterscheidet sich von letzterem durch den Besitz einer Ableitungsröhre, welche mit dem höchsten Punkte des Gasrohres in offener Verbindung steht. Dieses kann auf zwei Weisen erreicht werden, wie aus den Figuren 1 und 2 erhellt. In Fig. 2 befindet sich das Ableitungsrohr ausserhalb des Kölbchens und endet in eine Kapillarspitze, welche bei vollständiger Anfüllung von Gasrohr und Ableitungsrohr, infolge der Oberflächen-

---

[1]) Die Kölbchen wurden mir durch Dr. Rohrbeck in Berlin geliefert.

[2]) Ob überhaupt beweglich oder nicht, ist natürlich gleichgiltig.

[3]) Es giebt Bakterien, welche in Flüssigkeiten wachsen können von genau demselben spezifischen Gewicht, z. B. die Milchsäurefermente in Würzelösungen von 10° Balling kultiviert. Natürlich verteilen diese sich im Gärungskölbchen gleichmäßig über die ganze Flüssigkeit, auch im Gasrohre. Die Milchsäurebakterien sind aber fakultativ-anaërobische. Aërobienformen bleiben nach meiner Erfahrung, selbst in Malzwürze von 20° Balling, unterhalb einer scharfgezogenen Trennungslinie zu Boden des Gasrohres.

spannung, erst bei einigem Ueberdruck das Zurücksteigen oder das Auslaufen der Flüssigkeit ermöglicht und durch ihre Kleinheit den Sauerstoffzutritt genügend verhindert.

Das Kölbchen kann nur dann gebraucht werden, wenn darin keine Gasentwicklung stattfindet, weil anders die natürliche Trennung, welche die Bakterien von ungleichem Sauerstoffbedürfnis anstreben, verloren geht.

Kultiviert man in diesem Kölbchen in entsprechender Nährlösung ein Bakteriengemisch, worin Aërobien, Obligat- und Fakultativanaërobien vorkommen, so findet man nach einiger Zeit folgende Verteilung: Die Aërobien finden sich in der kugeligen

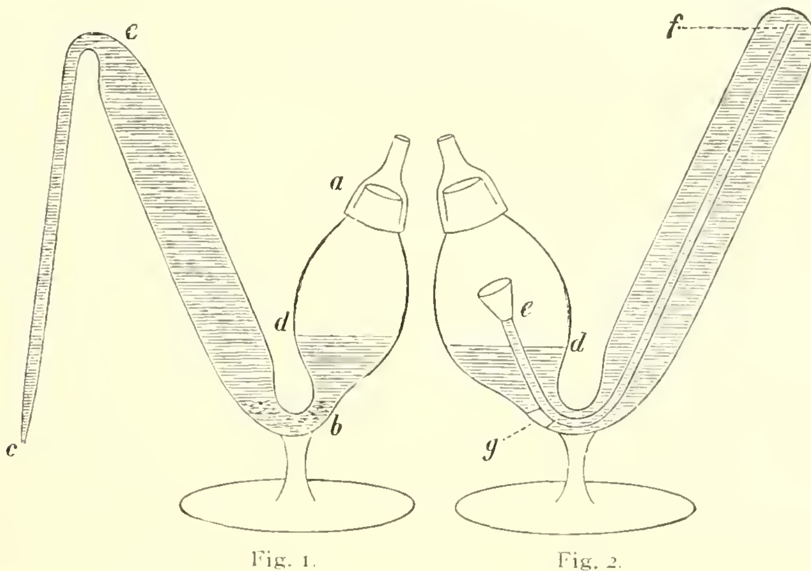


Fig. 1. Fig. 2.

Fig. 1. Kölbchen für rohe Trennung von Anaërobien und Aerobien. Bei Sulfatreduktion wird die Schwefeleisenbildung zuerst sichtbar im Präcipitat bei *b*. Aus der Kapillarspitze *c* kann bei schiefer Stellung des Kölbchens eine reichlich mit Sulfidferment beladene Kultur abtropfen, während bei *db* hauptsächlich nur aerobe Bakterien vorkommen; *a* Glashelm.

Fig. 2. Andere Form des Trennungskölbchens. In ein gewöhnliches, durch Glashelm verschlossenes Gärungskölbchen ist durch ein Glaströpfchen *g* ein Röhrchen eingeschmolzen, welches bei *e* in ein kleines Trichterchen, bei *f* offen endet. Wird die Nährflüssigkeit zwischen *e* und *d*, also außerhalb der inneren Röhre, infiziert mit einem Gemische von Aëroben und Anaeroben, so begeben sich die letzteren in größerer Anzahl in das Innenrohr wie die ersteren und können bei *e* für weitere Infektion gesammelt werden. Bei *e* kann man anfangs mit einem Tropfen Paraffin verschließen.

Erweiterung und bleiben unterhalb einer scharfgezogenen Trennungslinie am Boden der Gasröhre. Untersucht man die im Gasrohre oberhalb dieser Trennungslinie vorkommende Kulturflüssigkeit, so findet man, dass die Aërobien darin zwar nicht ganz fehlen, jedoch nur in verschwindend geringer Menge vorkommen. Werden Aërobien allein im Gärungskölbchen kultiviert, so bleibt die Nährflüssigkeit im Gasrohre vollständig klar und durchsichtig, in der Kugel und unterhalb des Niveaus im Gasrohre dagegen undurchsichtig und dick trübe. Mit fluorescierenden Bakterien, wie B. fluorescens non liquefaciens in Fleischbrühe kultiviert, ist dieser Versuch sehr elegant [1]).

[1]) Siehe ferner Th. Smith, Das Gärungskölbchen in der Bakteriologie (Centralblatt für Bakteriologie. Bd. VII. 1890. p. 503, Bd. XIV. 1893. p. 864).

Die Fakultativanaërobien sind über die ganze Flüssigkeit entweder gleichmässig verbreitet oder in der Kugel infolge der Schwere beträchtlich angehäuft, immer jedoch im Gasrohre sehr zahlreich.

Die Obligatanaërobien sind über die ganze Flüssigkeit ziemlich gleichmässig verteilt, so dass deren relative Zahl besonders in Bezug auf die Aërobien im Gasrohre viel grösser ist, wie wenn in der Flüssigkeit alles gleichmässig gemischt wird.

Die Erfahrung hat nun gezeigt, dass, wenn im Trennungskölbchen eine kräftige Reduktion stattgefunden hat und man lässt einen Tropfen aus der Kapillarspitze fliessen, darin sehr viel mehr Sulfidspirillen vorkommen, wie in den auf andere Weise gewonnenen Proben.

Die zweite Form des Trennungskölbchens ist in Fig. 2 abgebildet. Hier findet sich das Ableitungsrohr für die Anaërobien im Innern. Dieses Rohr endet einerseits offen in die Spitze des Gasrohres, andererseits in einen kleinen Trichter in der Anschwellung des Kölbchens, so dass daraus leicht mit einem Platinfaden oder einer Kapillarröhre etwas Infektionsmaterial entfernt werden kann für weitere Versuche.

Das Kölbchen wird beim Anfange des Versuches mit durch Kochen sterilisierter und luftfreier Nährlösung dermassen angefüllt, dass der kleine Trichter frei über dem Niveau der Flüssigkeit herragt. Es wird nun auf die gewöhnliche Weise infiziert und genau zugesehen, dass nichts in den Trichter hineinkommt. Das Infizieren muss sofort nach dem Abkühlen geschehen, und zwar im Aussenraume mit möglichst viel Impfmaterial, wodurch dem Luftzutritt ganz vorgebeugt wird. Beim Abkühlen muss nur die Kugel, nicht das Gasrohr mit Wasser übergossen werden, um die Ueberführung lufthaltiger Flüssigkeit ins obere Ende des Gasrohres durch das Sinken von kalter in warmer Flüssigkeit zu verhindern. Bei einiger Geschicklichkeit kann man die Kugel schon infizieren bei 25°, wenn im Gasrohre die Temperatur noch 66° C beträgt. Diese Bemerkungen gelten ebenfalls für das in Fig. 1 abgebildete Kölbchen mit äusserem Ableitungsrohre. Fürchtet man, dass Feuchtigkeit sich am Stiele des Trichters absetzen und durch Kapillarität zur Infektion des Innenrohres veranlassen wird, so kann vorher durch ein Tröpfchen Paraffin im Trichterchen das Innenrohr ganz abgeschlossen werden. Später kann die Paraffinschicht leicht mit dem Platinfaden oder mit einer Kapillarröhre durchstochen werden zur Erhaltung von Impfmaterial der im Rohre befindlichen Fakultativ- und Obligatanaërobien. Für die vorliegende Untersuchung wird im Aussenraume mit Grabenschlamm oder mit dem Sedimente einer vorhergehenden Reduktion infiziert; im Innenraume wird dann die Anhäufung des Sulfidfermentes (mit anderen Spirillen) bemerkbar.

Einen anderen Fortschritt machte das Kulturverfahren des Sulfidfermentes durch die Beobachtung, dass die Gegenwart der gewöhnlichen kleinen Wasserspirillen das Wachstum des Fermentes sehr fördert. Da ich nun Formen von Spirillum tenue Cohn seit längerer Zeit fortzüchtete, konnte ich auch diese Eigenschaft leicht in Anwendung bringen.

Spirillum tenue wächst auf den gewöhnlichen Nährböden zwar langsam, doch ohne besondere Schwierigkeit. Der Boden soll sehr schwach alkalisch reagieren und neutrale Salze organischer Säuren enthalten. Die Gegenwart von Pepton ist günstig. Von meinen drei Varietäten verflüssigen zwei die Nährgelatine durchaus nicht, die dritte etwas. In Fleischbouillon entstehen wunderschöne Kulturen, worin die Spirillen 20 und mehr Windungen annehmen. Charakteristisch für die Spirillen

ist die Bildung von sehr viel Calciumkarbonat, sowohl in festem wie in flüssigem Substrate.

Die Flüssigkeiten, womit das Trennungskölbchen am besten angefüllt wird, sind dieselben, wie bei den Rohkulturen angegeben. Doch habe ich auch andere Gemische verwendet. Bei gleichzeitiger Aussaat von Spirillum tenue fand ich, dass die Konzentration an organischen Stoffen in der Sulfatlösung ohne Nachteil eine viel höhere sein kann, wie ohne diesen Organismus. Nur müssen Zuckerarten, wie schon früher bemerkt, fern gehalten werden, damit keine Gärungen und keine Säuren entstehen.

In allen Fällen werden die Flüssigkeiten, ehe damit das Kölbchen angefüllt wird, durch Kochen sauerstofffrei gemacht und auch noch im Kölbchen selbst erhitzt.

Das Kölbchen habe ich z. B. angefüllt mit folgender Lösung:

Grabenwasser mit $^1/_4$ Proz. Kaliummalat,
$^1/_4$ Proz. Pepton siccum,
$^1/_{10}$ Proz. Mohrsalz,

durch Natriumkarbonat alkalisch gemacht und präzipiert.

Als ich infizierte mit frischem Grabenwasser und Spirillum tenue, war bei 28° C schon nach 24 Stunden Eisensulfid sichtbar.

Ein anderes Mal wurde das Kölbchen angefüllt mit Grabenwasser mit ¼ Proz. Asparagin, $^1/_5$ Proz. Magnesiumsulfat, $^1/_5$ Proz. Kaliumphosphat und $^1/_{10}$ Proz. Ferrolaktat und 1 Proz. Natriumkarbonat bei sehr schwacher Trübung. Es wurde infiziert wie vorhergehend. Obschon Spirillum tenue in diesem Gemische schlecht wächst, war doch bald eine reiche Bakterienentwicklung eingetreten und nach 48 Stunden bei 30° starke Schwefelwasserstoff- und Schwefelammonbildung. Selbst reine ½-proz. Peptonlösung mit $^1/_{10}$ Proz. Mohrsalz und etwas Natriumkarbonat haben zum Zwecke geführt. Hierbei stellte sich heraus, dass im allgemeinen eine desto kräftigere Reduktion erreicht wurde, je höher der Gehalt an organischen Stoffen war, welche überhaupt noch Reduktion gestatten. Da die organischen Stoffe jedoch zuvor durch die anderweitigen Bakterien zersetzt werden müssen, dauert es in solchen Fällen länger, bevor die Reduktion bemerkbar wird. Die höchsten Konzentrationen, welche ich untersuchte, waren eine Lösung von 1 Proz. Natriummalat, ½ Proz. Asparagin, ¼ Proz. Kaliumphosphat, ¼ Proz. ClNa, ¼ Proz. Natriumkarbonat und $^1/_{10}$ Proz. Mohrsalz in Grabenwasser. Auch darin war nach drei Tagen bei 28° C Schwefeleisen entstanden. Ich wünsche hier noch zu betonen, dass die Mischinfektion mit Spirillum tenue zwar günstig wirkt, jedoch für das Gelingen aller dieser Versuche nicht essentiell ist.

Natürlich liegt in der Biegung *b* des Kölbchens bei Verwendung der genannten Nährflüssigkeiten ein flockiges Präcipitat, worin sich zunächst das Sulfidferment ansiedelt und schwarze Flecke erzeugt. Später steigt die schwarze Färbung, wohl in Folge der Entstehung löslichen Eisensulfürs, höher ins Gasrohr hinauf und schwarze Flöckchen setzen sich an die vertikale Glaswand. Da diese Flöckchen sich zu langen, vertikalen Strichen heranbilden, offenbar durch das Nachuntenfallen des Sulfidfermentes, welches dann tiefer an das Glas festklebt, muss angenommen werden, dass diese Bakterien unter günstigen Lebensbedingungen sich nicht bewegen. Ueberhaupt weist, wie schon bemerkt, alles darauf hin, dass bewegliche Bakterien gewöhnlich in Ruhe sind und nur notgedrungen sich in Bewegung setzen.

Aus der im Reduktionskölbchen mit Sulfidfermenten bereiteten Nährflüssigkeit ist die Isolierung sowohl vermittelst Gelatine, wie mit Agar gelungen, und zwar besonders beim Agarverfahren ziemlich leicht.

Die Agarnährmasse war wie folgt bereitet:

Eine sehr klare, zweimal filtrierte wässerige Agarlösung wurde längere Zeit mit destilliertem Wasser ausgewaschen, zur vollständigen Entfernung aller löslichen Körper. Es wurde dazu die im Kochkölbchen erstarrte Masse einfach mit destilliertem Wasser übergossen, welches oft erneuert wurde. Es wurde dann geschmolzen und aufgekocht, eine äusserst geringe Menge einer Nährlösung zugesetzt, welche Natriummalat, Asparagin und Kaliumphosphat enthielt und aufs neue gekocht zur vollständigen Entfernung der Luft. Während des Abkühlens wurde ein Tropfen einer klaren neutralen Lösung von Mohrsalz zugegeben und eine so geringe Spur Natriumkarbonat, dass noch keine Trübung auftrat. Nachdem ein kleines Tröpfchen aus der Kapillarspitze des Reduktionskölbchens tüchtig untergemischt war, wurde unverweilt in Reagentienröhrchen oder in sehr flache Glasschalen und Glasdosen von verschiedener Konstruktion übergegossen und sofort in Wasser abgekühlt. Die Glasschalen bestanden aus millimetertiefen, decimeterweiten Schalen, durch eine polierte Glasplatte geschlossen, die Dosen (Fig. 3) aus den bekannten breiten Glasringen, worauf geschliffene Glasplatten gleicher Mittellinie genau passen, so dass ein flacher Raum entsteht von der Tiefe der Glasringdicke, von der Weite des Glasringinnenraumes. Dass bei einer solchen Versuchsanstellung weder in Reagentienröhren noch in Glasschalen eine vollständig sauerstofffreie Nährmasse zu erhalten ist, ist bekannt, und das Sulfidferment auf diese Weise zu kultivieren, wenn es allein gegenwärtig wäre, würde auch nicht gelingen. Es finden sich aber im Aussaatmateriale massenhaft andere Bakterien und diese machen nun zunächst das Medium ganz sauerstofffrei und bereiten dasselbe auch, eben wie für die Nährlösungen angegeben, auf andere Weise vor, so dass das Sulfidferment nach zwei oder mehr Tagen darin geeignete Bedingungen für Wachstum und Sulfatreduktion findet und Kolonieenbildung davon anfängt. Sind als Nebenflora Spirillen vorherrschend, so wachsen die Kolonieen ziemlich lange, jedenfalls geht die Reduktion dann ruhig fort, bis alles Sulfat zerlegt, alles Eisen als Schwefeleisen abgesetzt ist. Spielen andere Bakterienarten als Spirillen neben dem Sulfidfermente die Hauptrolle, so sind die Erscheinungen in den festen Substraten sehr abwechselnd, oft überraschend und durchaus nicht immer erklärbar. Nicht selten beginnt die Reduktion in solchen Fällen stürmisch, um schon nach zwei oder drei Tagen zur Ruhe zu kommen und nicht wieder zu beginnen. Die Kolonieen sind dann so klein, dass man besser thut, von neuem anzufangen. Jedenfalls ist es ratsam, nur gut ausgewachsene Kolonieen für weitere Kulturen zu verwenden, da selbst darin die Zahl der Bakterien klein ist und oft kaum tausend beträgt. Die Kolonieen scheinen bei dem hier beschriebenen Verfahren zwar gross, doch rührt dieses von dem Eisensulfürmantel her; wird dieser in Säure gelöst, so verschwinden die Kolonieen für das Auge oft ganz. Das Wachstum der Kolonieen kann dadurch gefördert werden, dass eine Agarplatte, worin dieselben vorkommen, entweder ganz aus den Glasplatten gelöst oder noch zum Teil oder ganz dazwischen geschlossen in eine für Sulfatreduktion geeignete Nährlösung untergetaucht wird. Wird die Flüssigkeit dann und wann erneuert, so kann das Wachstum der Kolonieen lange fortdauern. Dünne Agarplatten können füglich ineinandergerollt, in weithalsige Stöpselflaschen gebracht

werden, während noch zwischen den Glasplatten befindliche Agarschichten, wo die Nährlösung nur peripherisch zutreten kann, besser in Glasdosen gelegt werden, welche ganz mit der Kulturflüssigkeit angefüllt und durch gut aufgeschliffenen Deckel vollständig von der Luft abgeschlossen sind. Doch habe ich auch bei Anwendung dieses Kunstgriffes immerhin noch mit sehr kleinen Bakterienmassen zu schaffen gehabt, welche einige Vorsicht erforderten, um davon mit dem Platinfaden eine Prise zu nehmen, so dass Aussaaten, welche man von Kolonieen hergenommen zu haben meint, vielfach steril bleiben. Ueberhaupt ist die Schwierigkeit der Isolierung in die letzten Schritte der Manipulation gelegen, und einmal isolierte Kulturen sind für weitere Experimente erst recht unangenehm zu handhaben, da es schwierig ist, ohne Mithilfe lebender Organismen einen absolut sauerstofffreien Kulturraum darzustellen. Unsere

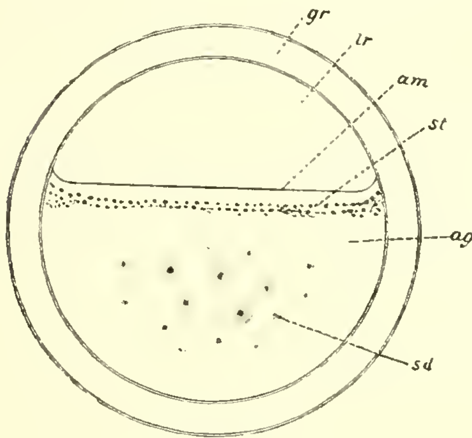


Fig. 3.

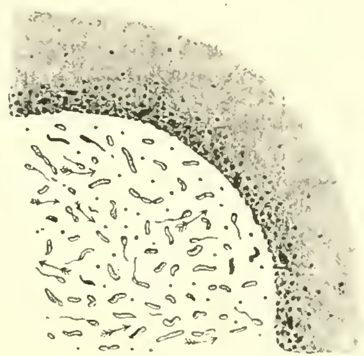


Fig. 4

Fig. 3. Kultur von einem Gemische von Spirillum tenue (*st*) und S. desulfuricans (*sd*) in Agar (*ag*) zwischen zwei durch Glasring (*gr*) getrennte Glasplatten. Der Hohlraum ist nur teilweise angefüllt, *lr* ist der Luftraum, *am* der Agarmeniscus. Die Schicht der Kolonieen von Spirillum tenue liegt in einiger Entfernung vom Meniscus bei *st*, hat sich also bei verminderter Sauerstoffspannung gebildet. Kolonieen von Spirillum desulfuricans sind durch Schwefeleisenablage schwarz und auch ihre Umgebung ist dadurch gefärbt.

Fig. 4. (1000.) Eine Kolonie von Spirillum desulfuricans wie Fig. 3 stark vergrößert. Im Agar und in der Kolonie zahlreiche Schwefeleisenniederschläge. Die Spirillen teilweise tot und schwarz. Die Bewegung durch Pfeile angegeben.

geringen Kenntnisse in Bezug auf die Bakterien der Peptonfäulnis, worunter die interessantesten Arten eben wie das Sulfidferment Anaërobien sind, beweisen, beiläufig bemerkt, dass ich nicht der einzige bin, diese Schwierigkeit zu empfinden [1]). Uebrigens habe ich mich in diesem Falle nur so lange mit Versuchen mit Reinkulturen beschäftigt, als nötig war für die sichere morphologische Charakteristik, und zur Feststellung der Thatsache, dass die Reduktion der Sulfate durch das Ferment ohne Mithilfe anderer Bakterien möglich ist.

[1]) Ich wünsche hier noch zu betonen, daß es zwei Klassen von echten Anaërobien giebt. Die eine Klasse, repräsentiert durch das Butylferment, vermag die letzten Spuren Sauerstoff aus den Nährmedien zu absorbieren, wobei die morphologisch so charakteristische »Sauerstoffform« auftritt. (Die Butylalkoholgärung. p. 27. Amsterdam 1893.) Die zweite Klasse, wozu das Sulfidferment gehört, besitzt eine solche Sauerstoffform nicht und fordert absolute Abwesenheit des Sauerstoffes, um zur Entwicklung zu kommen.

Doch betrachten wir die Eigenschaften der Kolonieen. Ob diese in Gelatine oder Agar eingeschlossen liegen, ist gleichgiltig. Formverschiedenheit war dazwischen nicht zu bemerken, Verflüssigung der Gelatine findet nicht statt.

Bei Abwesenheit von Eisensalzen sind die äusserst kleinen Kolonieen durch nichts charakterisiert, Pigmentbildung fehlt vollständig [1]).

Bei Gegenwart von Eisensalzen sind die Kolonieen sehr leicht kennbar (Fig. 3), doch muss bemerkt werden, dass die dem Schwefeleisen entlehnten Eigenschaften natürlich nur dann für das Sulfidferment eigentümlich sind, wenn keine anderen Schwefelquellen als Sulfate gegenwärtig sind, und dass sie anderenfalls auch bei mehreren anderen Bakterienarten, welche auf andere Weise Schwefelwasserstoff bilden, zurückgefunden werden. Doch besitzen diese letzteren Bakterien keine Spirillengestalt, so dass die Diagnose durch Bezugnahme auf die mikroskopischen Eigenschaften immer möglich sein dürfte. Allerdings ist die Spirillengestalt des Sulfidferments nicht jederzeit scharf ausgeprägt.

Die reduzierenden Kolonieen können unter zwei Formen auftreten, entweder mit einer diffusen, sich allmählich in die Umgebung verlierenden Schwefeleisensphäre, oder als intensiv schwarze Punkte ohne eine solche Sphäre. Worauf dieser Unterschied beruht, ist mir nicht deutlich geworden; nur in den mit einer Sphäre versehenen Kolonieen habe ich weitere Reduktionen anstellen können, nicht mit der anderen Form. Das Vorkommen beweglicher Individuen bei der zweiten Form beweist, dass hier nicht der Unterschied zwischen Leben und Tod vorliegt. Da es mir nicht möglich war, irgend einen konstanten morphologischen Unterschied zwischen den Bakterien beider Kolonieformen zu unterscheiden, habe ich keine Ursache, dabei an verschiedene Bakterienarten zu glauben, doch muss ich bemerken, dass aus den Kolonieen mit der Sphäre nur ähnliche Formen in den davon abgeleiteten Kulturen entwickelt sind.

Die Sphäre rings um die Kolonieen besteht, wie gesagt, aus Schwefeleisen (Fig. 4). Dieses kommt vor sowohl als gleichmässige, sich nach aussen allmählich verlierende Färbung des Agars oder der Gelatine und als aus kleinen Kugeln, seltener unregelmässigen Klumpen bestehender Niederschlag. Die kleinen Kugeln sind alle nahezu gleich gross und gleichen täuschend Mikrokokken. Da sie sich vollständig in Salzsäure lösen, liegt keine Ursache vor, darin ein organisches Skelett (wie in den zwar viel grösseren Calciumkarbonatsphäriten, welche entstehen, wenn Natriumkarbonat und Chlorcalcium bei Gegenwart von Eiweiss oder Gelatine aufeinander einwirken) anzunehmen, offenbar bestehen dieselben aus reinem Schwefeleisen. Die Kügelchen liegen ebenfalls innerhalb der Kolonieen, zwischen den Bakterien zerstreut, doch ist ihre Zahl hier viel beschränkter, wie überhaupt der von den Bakterien angefüllte Raum auffallend wenig gefärbt erscheint.

Bei dem hier beschriebenen Versuche haben wir vorausgesetzt, dass im Trennungskölbchen neben dem Reduktionsfermente gewöhnliche Wasserspirillen im Uebermasse vorkommen. Dieses war dadurch erreicht, dass neben Infektionsmaterial, worin das Sulfidferment, auch eine Kultur von Spirillum tenue zugesetzt wurde. Bei der Verwendung von Pepton oder organisch saurem Salze und Mohrsalz als Schwefelquelle und Indikator hat Spirillum tenue ein so starkes Reproduktionsvermögen,

---

[1]) Zelinsky's Bacterium hydrosulfureum ponticum verflüssigt Gelatine und erzeugt ein braunes Pigment.

das die übrigen Bakterienarten mehr oder weniger vollständig zurückgedrängt werden. Die Folge davon ist, dass in einer Aussaat zwischen Glasplatten, wie in Fig. 3 abgebildet, wo die Luft einerseits zutreten kann, auch nur Spirillum tenue und die Sulfidfermente Kolonieen in gewisser Menge erzeugen, die fremden Bakterienkolonieen, besonders die aërobien, beinahe ganz eliminiert sind.

Es sei mir gestattet, hier auf eine Eigentümlichkeit im Wachstume der Kolonieen von Spirillum tenue aufmerksam zu machen, welche in Bezug auf das Verhältnis der Mikroorganismen zum freien Sauerstoff von tiefer Bedeutung ist. Diese Eigentümlichkeit besteht darin, dass bei gleichmässiger Verteilung der Spirillen im Substrate die Kolonieen in einer bestimmten Entfernung vom Meniscus stark angehäuft und nur dort von bedeutender Grösse vorkommen (*st* Fig. 3), während höher und tiefer von den Spirillenkolonieen nichts mehr zu bemerken ist. Offenbar entstehen die Kolonieen an einer Stelle im Nährboden, wo die Spannung des gelösten Sauerstoffes eine ganz bestimmte und sehr geringe ist. Bei einer anderen Gelegenheit habe ich die beweglichen Bakterien nach ihrer Beweglichkeit in Bezug auf den gelösten freien Sauerstoff zu drei Typen gebracht: dem Aërobientypus, dem Spirillentypus und dem Anaërobientypus, je nachdem eine Ansammlung der betreffenden Arten stattfindet an den Stellen der höchsten, einer mittleren und der geringsten Spannung. Wir sehen nun, dass diese drei Bewegungstypen ihr Analogon in den Wachstumsverhältnissen finden, und wir sind offenbar berechtigt, aus der einen Erscheinungsreihe auf die Modalität in der anderen zu schliessen. Die tiefere Erklärung des hier aufgestellten Parallelismus wird wohl die sein, dass sowohl Wachstum wie Bewegung eine optimale Intensität erreichen bei identischen Sauerstoffspannungen. Es erhebt sich die Frage, ob bei dem Spirillum tenue, bei jener mittleren Tension, welche sich als optimale ergiebt, auch die Kohlensäureabgabe eine mittlere ist oder eben dabei zu einem Maximum ansteigt. Die letztere dieser beiden Möglichkeiten ist wohl die wahrscheinlichere, denn bei den Obligatanaërobien verhindert der Sauerstoffzutritt die Kohlensäureabgabe gänzlich.

Doch kehren wir zurück zur Betrachtung des Sulfidfermentes.

Die in Agar oder Gelatine eingeschlossenen Kolonieen sind aus kurzen, nur sehr wenig gewundenen Spirillen zusammengesetzt, welche gewöhnlich ca. 4 μ lang und ca. 1 μ dick sind, nur wenige erreichen eine grössere Länge oder bleiben ganz kurz. Die Zahl der Windungen ist ½—1 und nur selten kommt mehr wie eine ganze Windung zur Beobachtung. Die meisten Individuen sind mässig schnell beweglich, jedoch nur solange der Sauerstoffzutritt zu den Präparaten verhindert wird. Wenn dieses Gas zufliessen kann, ziehen die mehr beweglichen Exemplare sich nach der sauerstoffarmen Mitte des Präparates zurück, während die weniger beweglichen ganz gelähmt werden und bewegungslos liegen bleiben. Also dasselbe Verhalten, welches ich früher für den Einfluss des Sauerstoffes auf die Beweglichkeit des anaërobischen Butylfermentes beschrieben habe [1]). In den Kolonieen, welche bei Gegenwart von Eisensalzen entstanden sind, liegen überall zwischen den Spirillen die nämlichen schwarzen mikrokokkenartigen Eisensulfürniederschläge, welche wir schon früher in der Umgebung der Kolonieen kennen lernten (Fig. 4). Abgestorbene Spirillen werden an sich Attraktionscentra für Schwefeleisenablagerung, sie werden dabei intensiv

[1]) Centralblatt für Bakteriologie. Bd. XIV. 1893. p. 841.

schwarz und schwellen gewaltig an, oft kommt dabei die Spirillengestalt sehr deutlich zur Ausprägung [1]).

An vielen Sulfidspirillen konnte ich nicht ohne Mühe einen terminalen Schwärmfaden oder Schwärmfädenbüschel beobachten. Die in den Flüssigkeiten vorkommende Form des Fermentes ist meistens noch kleiner wie diejenige in den Kolonieen im festen Substrate, doch bleibt man auch dabei nicht unsicher über die Spirillennatur. Ich glaube deshalb, dass unser Ferment mit dem Namen Spirillum desulfuricans belegt werden kann.

Wenn ich hier das Sulfidferment unter dem »Genusnamen« Spirillum einzuführen versuche, so muss ich betonen, dass ich eine solche Einreihung nur für eine vorläufige halten kann, denn es ist sicher, dass die bisher als Spirillum angeführten Organismen untereinander tief verschieden sind. Dieses gilt z. B. in Bezug auf das Verhalten der Spirillen zum freien Sauerstoff. Dabei kommen drei scharf getrennte Typen zur Beobachtung, welche sowohl durch das Kolonieenwachstum im festen Nährsubstrate, wie durch die »Atmungsfigur« bei der Bewegung kenntlich werden. Wir finden nämlich den Aërobientypus bei dem Spirillum tyrogenum (auch bei Cholera), den Spirillentypus bei Spirillum tenue, den Anaërobientypus bei Spirillum desulfuricans.

Es ist wahrscheinlich, dass diese physiologischen Verschiedenheiten die Folge sind von nur sehr entfernter systematischer Verwandtschaft, welche dereinst veranlassen dürfte, unsere gegenwärtige künstliche Gattung Spirillum wenigstens in drei natürliche Gattungen zu spalten. Doch wird diese Zeit erst kommen, wenn wir über das gesamte Bakteriensystem einen besseren Ueberblick besitzen, wie heute.

Hat man Spirillum desulfuricans einmal in Reinkultur gebracht, so muss man nicht glauben, dass dann die Schwierigkeiten für die weitere Untersuchung verschwunden sind. Ganz im Gegenteil, dieselben werden dann noch viel grösser wie beim Rohmaterial. Dieses resultiert aus der Notwendigkeit der Durchführung von Kautelen, wodurch der Sauerstoff vollständig entfernt wird, und Jeder, welcher sich mit solchen Versuchen beschäftigt hat, welche sehr oft wiederholt werden müssen, weiss, wie aufreibend es ist, in dieser Beziehung radikal zu handeln, wenn man dabei nicht aërobische Mikrobien zu Hilfe nehmen kann. Vielleicht wäre die Verwendung von Ferrosulfat, anstatt Mohrsalz, in dieser Beziehung empfehlenswert. Doch auch das wäre nur Notbehelf. Obschon ich mich seit mehr als 2 Jahren mit dem Sulfidfermente beschäftige, habe ich infolge jenes Umstandes doch Vieles noch nicht sicher festgestelt, was zur Biologie desselben gehört. Selbst die dafür notwendige Zeit hat mir gefehlt, denn man bedenke, dass das schliessliche Resultat eines Reduktionsversuches oft erst nach 3—4 Wochen bekannt ist, und dass bei der Versuchsanstellung mit Reinkulturen die meisten Versuche fehlschlagen. Noch nicht entschieden sind z. B. die folgenden Fragen: Vermag das Sulfidferment andere Körper wie Sulfate zu reduzieren, z. B. Indigkarmin, Lackmus, Ferrisalze, Nitrate? Sind die Sulfidfermente,

[1]) Bei meinen Versuchen habe ich einmal eine stattliche Spirillenart beobachtet, welche im lebenden und beweglichen Zustande Schwefeleisenkörner im Inneren abgelagert hatte. Auch R. Koch scheint diese Art gefunden zu haben, und er bezeichnet dieselbe (Koch sagt »nach Perty«, doch suchte ich in »Kleinste Lebensformen« vergebens nach diesem Namen) als Spirillum leucomelaenum. (Mitteilungen des Gesundheitsamtes. Bd. I 1881. p. 48.)

welche an thonigen Meeresküsten zu der sehr umfangreichen dort herrschenden Schwefelwasserstoff- und Schwefeleisenbildung veranlassen, identisch mit Spirillum desulfuricans? und wie wirkt der Salzgehalt auf unser Ferment? Gehört das Sulfidferment in unseren Gräben und Teichen sowie im Boden immer zu ein und derselben oder zu mehreren Arten? Auch die besonders wichtige Frage nach der Tiefe, bis zu welcher das Ferment im Boden vorkommt, und die Bezeichnung der Stelle, wo die Sulfatreduktion in dafür geeigneten Böden vollendet ist, sind noch ungelöste Probleme.

Ueber Nachweis und Verbreitung der Glukase, das Enzym der Maltose.

Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde, Jena, II. Abteilung, I. Band, 1895, S. 221—229, 265—271, 329—342.

Bei der enzymologischen und botanischen Besprechung eines Enzymes wie die Glukase, worüber noch so wenige Untersuchungen vorliegen und dessen Nachweis bisher mit erheblichen Schwierigkeiten verbunden war, dürfte es nicht überflüssig sein, einige Bemerkungen über die amylolytischen Enzyme im allgemeinen sowie über die Methoden der Hydrodiffusion im festen Substrate und der Auxanographie, wodurch die Untersuchung jener Enzyme und ihrer Umwandlungsprodukte so ausserordentlich vereinfacht wird, und welche bisher noch nicht die gebührende Berücksichtigung durch andere Forscher gefunden haben, vorauszuschicken. Ich werde dabei einige Ergebnisse, welche erst im späteren Teile dieses Aufsatzes begründet werden, schon vorgreifend berücksichtigen, auch werden einige Erfahrungen berührt werden, welche hier nicht näher erwiesen sind, deren Nachweis nach unserer Methode jedoch so einfach ist, dass jeder dieselben leicht wird kontrollieren können. In Bezug auf die hier zu befolgende Nomenklatur dieser verschiedenen Körper wünsche ich zu bemerken, dass es sehr empfehlenswert ist, nach dem Beispiele der französischen Forscher das Wort »Amylase« als Kollektivnamen für sämtliche stärkespaltenden Enzyme zu verwenden, und den Namen »Granulase« als partiellen Kollektivnamen für diejenigen Amylasearten, welche aus Stärke zu gleicher Zeit Maltose und Achroodextrin erzeugen. Durch einen Blick auf die Tabellen wird man sofort sehen, wie nötig und nützlich diese Verbesserung der Nomenklatur ist. Ich hätte es vorgezogen, hier den Namen »Dextrinase« zu verwenden, doch ist dieses Wort schon in einem anderen und ganz bestimmten Sinne, und zwar für ein aus Malzamylase entstehendes, von Wysman entdecktes Kunstprodukt verwendet. — Für die Glukase werde ich unten die ältere Geschichte, welche, wie ich meine, im Deutschen noch nicht gegeben wurde, in Uebersetzung anführen, namentlich die Begründung von Cuisinier's Patent.

Dass ich überall das Richtige getroffen haben sollte, kann ich bei einer so verwickelten Untersuchung wie diese kaum hoffen. Und dass später etwa nachzuweisende Fehler einige Nachsicht beanspruchen, werden einsichtige Forscher wohl zustimmen.

Kapitel I.

Untersuchungsmethoden [1]).

Bei der Untersuchung der verschiedenen Amylasearten handelt es sich gewöhnlich um den Nachweis sehr kleiner Mengen. Da hierbei noch überdies oft Enzymgemische vorliegen, auch andere bekannte und unbekannte gewöhnliche organische Körper nicht fehlen, und da bei diesen Versuchen Bakterien leicht störend eingreifen können, so war es erwünscht, ein Verfahren ausfindig zu machen, wodurch es gelingt, die genannten Schwierigkeiten zu beseitigen. Von der Voraussetzung ausgehend, dass die Amylasen im Gegensatze zu der herrschenden Ansicht gut diffundierende Körper sind, erschien es, dass die Methode der Hydrodiffusion in stärkehaltigen Gelatineplatten zu wichtigen Ergebnissen würde führen können. Und diese Erwartung wurde durch die Erfahrung nicht getäuscht. Bei der Untersuchung der amylolytischen Vorgänge nach dem genannten Prinzipe kommen die drei folgenden Mittel und Wege zur Verwendung:

Erstens, die Hydrodiffusion in festem Substrate zur Trennung der Enzyme von ihren Trägern, sowie zu deren Trennung unter sich, fürsoweit sie überhaupt und mit ungleicher Geschwindigkeit diffundieren.

Zweitens, das gewöhnliche chemische Reaktionsverfahren im festen Substrate, z. B. die Jodreaktion für den Nachweis der Umwandlungsprodukte der Stärke, wie Achroodextrin und Erythrodextrin.

Drittens, das Mikrobienwachstum im festen Substrate (Auxanographie) zum Nachweise von Zuckerarten, wie Glukose und Maltose.

Da ich selbst schon früher die hier zunächst in Betracht kommende auxanographische Methode beschrieben habe [2]), und da die Methode der Hydrodiffusion in Gelatine, sowie die Jodreaktion im festen Substrate für die Diastase des Gerstenmalzes durch Herrn Wysman ausführlich untersucht und behandelt sind (l. c.), so kann ich hier zwar auf diese Arbeiten hinweisen, jedoch erscheint eine gedrängte Uebersicht der befolgten Methoden erwünscht.

1. Das Diffusionsverfahren.

Die Beschreibung eines Beispiels ist am besten geeignet, das Verfahren zu beleuchten. Wählen wir als solches den Nachweis der beiden Enzyme, welche sich im ungekeimten und im gekeimten Gerstenkorne vorfinden. Weizen und Roggen verhalten sich, beiläufig bemerkt, wie Gerste, ebenso Aegilops ovata, Hafer dagegen abweichend.

Man fertige eine 10-proz. Gelatinelösung in destilliertem Waser an, füge ca. ½ Proz. Kartoffelstärke, oder besser ebensoviel lösliche Stärke [3]) hinzu, erhitze einige Minuten auf dem Siedepunkte, giesse die Lösung zu einer sehr dünnen Schicht in eine Glasdose mit gut geebnetem Boden aus und lasse sie erstarren.

[1]) Ein für allemal verweise ich hier auf die Schrift: H. P. Wysman, De diastase beschouwd als mengsel van Maltase en Dextrinase. Amsterdam (Spin & Co.) 1889.

[2]) Archives Néerlandaises. T. XXIII. 1888. p. 367. (Baumgarten's Jahresber Bd. V. 1889. p. 571. Siehe auch dieses Blatt. Bd. VIII 1890 p. 618 und 651.)

[3]) Bereitet nach Lintner's Vorschrift, Journal für prakt Chemie. 1886 p. 378

Das zu untersuchende gekeimte Gerstenkorn wird mit dem Rasiermesser senkrecht zur Längsachse in Querschnitte zerteilt und diese Querschnitte werden auf die Oberfläche der Gelatineplatte gelegt.

Die beiden Enzyme, die Maltase und die Granulase diffundieren aus den Querschnitten in die Gelatine hinein, wirken amylolytisch auf die Stärke und erzeugen dabei ein ohne weiteres sichtbares, cirkuläres Diffusionsfeld. Obschon die Malzamylase zwar schneller wie andere Amylasearten diffundiert, sich jedoch immerhin ziemlich langsam fortbewegt, nämlich mit ungefähr derselben Schnelligkeit, womit Dextrin und Pepton diffundieren, so ist es erwünscht, den Versuch zwei oder mehrere Tage fortzusetzen, damit das Diffusionsfeld ausgedehnt werde. Fürchtet man, dass der Querschnitt mit Schimmel oder Bakterien verunreinigt ist, so bringt man in die umgekehrte aufgestellte Dose eine kleine Schale mit Chloroform. Der Dampf dieses Körpers erfüllt den Raum und verhindert Mikrobienwachstum, ohne die diastasische Wirkung zu stören.

Maltase erzeugt aus Stärke Maltose neben Erythrodextrin, die Granulase dagegen Maltose und Achroodextrin. Da das Erythrodextrin sich mit Jodlösung rot färbt, so muss die Gelatinestärkeplatte, wenn sie mit Jod-Jodkaliumlösung übergossen wird, sich blau färben dort, wo kein Enzym hinzugetreten ist und rot dort, wo die Maltase allein eingewirkt hat. Da ferner die Maltase etwas schneller diffundiert wie das Erythrodextrin, so kann sich letzterer Körper nur innerhalb des Maltosediffusionsfeldes vorfinden, womit es die äussere Grenze gemeinsam hat. Eine absolute Identität zwischen der Maltase- und Erythrodextringrenze kann jedoch schwerlich da sein, denn es wird eine bestimmte Konzentration des Enzyms sowie eine bestimmte Einwirkungszeit davon auf die Stärke gefordert, um die Spaltung zu ermöglichen. Das Enzym dürfte deshalb bei der Diffusion immer ein wenig an das Erythrodextrin vorauseilen, was jedoch für unseren Zweck gleichgiltig ist.

Geht man nach genügender Diffusionszeit über zur Uebergiessung der Gelatineplatte mit einer Lösung von Jod-Jodkalium, so bemerkt man die folgende Erscheinung:

Während die Platte sich übrigens blau färbt, findet man, dass das Diffusionsfeld der Malzamylase zweifarbig ist, und zwar im Innern farblos, und dieser farblose Zirkel wird durch einen violettroten Erythrodextrinring eingeschlossen. Der Erythrodextrinring ist sehr schmal bei den Querschnitten der gekeimten, sehr breit bei denjenigen der ungekeimten Getreidekörner.

W y s m a n hat nun nachgewiesen, dass diese Erscheinung folgenderweise erklärt werden muss: Die beiden im Malze enthaltenen Enzyme diffundieren mit ungleicher Geschwindigkeit: die Maltase eilt dabei der Granulase[1]) voraus, woraus folgt, dass soweit die Granulase diffundiert ist, diejenigen Umwandlungen der Stärke stattgefunden haben mussen, welche darin durch die gleichzeitige Einwirkung der Maltase und Granulase zustande kommen. Da diese Endprodukte jedoch Maltose und Achroodextrin sind, so muss dieser, den beiden Diffusionsfeldern der Maltase und Granulase gemeinsame Teil, mit Jod farblos bleiben. Rings um dieses farblose Feld muss aber ein Ring vorkommen, wo nur die vorausgeeilte Maltase angekommen ist und die Granulase fehlt. Da aber die Maltase aus Stärke neben Maltose

[1]) W y s m a n hat hier das Wort »Dextrinase« verwendet. Unten werde ich noch anführen, weshalb ich einen anderen Namen wählen mußte.

noch Erythrodextrin erzeugt, so muss dieser Teil sich mit Jod violett färben. Von der Maltose, welche bei diesem Versuche neben dem Erythrodextrin durch die Einwirkung der Maltase auf die Stärke entsteht, bemerkt man bei dieser Versuchsanstellung nichts, dieselbe diffundiert nach allen Seiten in die Gelatineplatte hinein. Die auxanographische Methode erlaubt aber eben die Maltose nachzuweisen. Die geringe Breite des Erythrodextrinringes beim gekeimten Getreidekorne, verglichen mit dem ungekeimten, rührt daher, dass der Keimling nur Granulase erzeugt, und die Maltasereproduktion aus dem Endosperm beim Keimprozess nur wenig zunimmt. Uebrigens verweise ich bezüglich der interessanten Lokalisationsverhältnisse der Enzyme im Malzkorne auf Wysman's Schrift.

2. Die auxanographische Methode.

Für den Nachweis der Maltose und der Glukose, welche durch amylolytische Enzyme entstehen (unter bestimmten Umständen auch der Laktose und Saccharose und deren durch Laktase und Invertase gebildeten Inversionsprodukte), lassen sich bei der Anwendung der Diffusionsmethode mehrere Lebenserscheinungen der Mikrobien benutzen. Besonders zwei davon kamen zu näherer Untersuchung, nämlich, erstens, das *Wachstum* von bestimmten Mikrobien, welche dem festen Substrate in genügender Anzahl einverleibt sind, und, zweitens, die *Leuchtfunktion* der Leuchtbakterien. Da die Leuchtbakterien sowohl mit Maltose wie mit Glukose Licht erzeugen, so habe ich bei der Untersuchung der Glukase, wobei es sich eben um den differentiellen Nachweis dieser Zuckerarten im festen Substrate handelt, die Leuchtfunktionen nicht in erster Linie benutzen können, dafür aber das Wachstum von anderen Mikrobien, und zwar besonders von verschiedenen Hefearten, mit gutem Erfolge in Anwendung gebracht.

Unter den Hefen im weiteren Sinn giebt es besonders vier Gruppen, welche für diese Untersuchungsrichtung von Wichtigkeit sind, nämlich, erstens die *Glukosehefen* das heisst die Arten, welche Glukose und Laevulose assimilieren, nicht aber Saccharose, Laktose, Maltose und Dextrin, z. B. S. apiculatus, und bestimmten Umständen auch Mycoderma cerevisiae und M. vini. Zweitens, die *Saccharosehefen*, welche Glukose, Laevulose und Saccharose assimilieren, nicht aber Laktose, Maltose und Dextrin, hierzu z. B. Saccharomyces fragrans. Drittens die *Maltosehefen*, welche Glukose, Laevulose, Maltose und gewöhnlich auch Saccharose, nicht aber Laktose und Dextrin assimilieren; hierzu z. B. S. cerevisiae, S. ellipsoideus, S. minor. Viertens, die *Lactosehefen*, welche Glukose, Laevulose, Saccharose und Lactose assimilieren, jedoch nicht Maltose und Dextrin; hierzu S. Kefyr und S. Tyrocola. Fünftens die *Polysaccharosehefen* welche Glukose, Laevulose, Saccharose, Maltose und Dextrin wohl, Lactose aber nicht assimilieren; hierzu z. B. Mycoderma sphaeromyces und Saccharomyces acetaetylicus. Durch Herbeiziehung von anderen assimilierbaren Stoffen, wie Glycerin und Natrium- oder Calciumacetat kann diese Stufenleiter von Hefen von absteigender Spezialisierung noch ausgedehnt werden, was aber für den gegenwärtigen Zweck unnötig wäre.

Wir sehen aus dieser Uebersicht, dass gewisse Hefearten sehr wählerisch in Bezug auf die dargebotenen Zuckerarten sind, und wir können diese Eigenschaft verwenden für den Nachweis der durch amylolytische Enzyme produzierten Körper. Für

unseren gegenwärtigen Zweck, wobei es sich darum handelt, Glukose als Produkt der Umwandlung von Maltose nachzuweisen, kommen zunächst die Glukosehefen in Betracht, welche Glukose assimilieren und damit wachsen, jedoch Maltose unberührt lassen. Werden dieselben mit genügender Einsicht für auxanographische Versuche verwendet, so können damit sehr überzeugende und demonstrative Resultate erhalten werden und unwägbar geringe Mengen Glukose bei Gegenwart von Maltose, Dextrin, Stärke und zahllosen anderen organischen Körpern mit vollständiger Sicherheit nachgewiesen werden. Es sei vorher bemerkt, dass alle von mir untersuchten Hefen und Bakterien nicht imstande sind, Enzyme an sich direkt zu assimilieren, und sei es als Stickstoff oder Kohlenstoffquelle zu verwenden. Ich habe dieses mit vieler Sorgfalt festgestellt, weil der Wert meiner Methode davon offenbar abhängig ist, und zwar auf folgende Weise: Wenn ein Amylasediffusionsfeld sich in einer Platte von Nährgelatine bildet, worin dasselbe durch ein wenig lösliche Stärke sichtbar gemacht wird, so muss dasselbe zirkelrund werden, wenn die Gelatineplatte gleichmässig dick ist und die Diffusion von einem Punkte oder Zirkel ausgeht. Wird nun im Bereiche dieses Diffusionsfeldes eine Kolonie oder ein Impfstrich der zu untersuchenden Hefeart oder Bakterie gelegt in der Weise, dass das Enzym darunter bei der Diffusion passieren muss, so wird das Diffusionsfeld rund bleiben, wenn das Enzym nicht absorbiert wird, dagegen wird selbst das geringste Mass der Absorption oder Assimilation des Enzyms durch die Kolonie zu einer Abplattung oder anderweitigen, zuvor bestimmbaren Formveränderung des Diffusionsfeldes Veranlassung geben müssen. Lässt man nun in der Nährgelatine die Stickstoffquelle fort unter Beibehaltung des Kohlehydrates, so ergiebt sich, dass die Hefen (und Bakterien) das Enzym nicht als Stickstoffquelle benutzen können; lässt man das Kohlehydrat weg unter Beibehaltung der Stickstoffnahrung, so findet man, dass das Enzym auch nicht als Kohlenstoffquelle fungieren kann. Das Resultat stimmt damit, dass im tierischen Organismus das Ptyalin und die Pankreasdiastase mit dem Urine abgesondert werden, und dass bei den höheren Pflanzen die einmal vorhandene Diastase sehr hartnäckig in dem Gewebe zurückbleibt.

Zu den allbekannten Hefearten, welche für den Nachweis von Glukose vermittelst der auxanographischen Methode Verwendung finden können, gehören, wie gesagt, der Kahmpilz (Saccharomyces Mycoderma var. cerevisiae und vini) und Saccharomyces apiculatus, welche beide, bei übrigens geeigneter Ernährung mit Stickstoff- und Aschenbestandteilen, Glukose zu ihrem Wachstume verwenden, dagegen Maltose und Dextrin (und Rohrzucker) unberührt lassen. Ich habe dieselben darum als Glukosehefen zusammengefasst. Ferner können zu demselben Zwecke die Saccharosehefen verwendet werden. Hierher gehört z. B. eine von mir als Saccharomyces fragrans bezeichnete Hefeart. Diese Form ist nach gewissen Bakterienarten, der Hauptfeind der Presshefe und, weil daraus durch Waschen schwierig ganz zu entfernen, auch in der Presshefe des Handels immer gegenwärtig (ungefähr zu 1 auf 100 000). Beim »Würzeverfahren« der Presshefefabriken bildet diese Hefe die bekannte, sich beim Waschen schnell absetzende »schwere Schicht«. Sie besteht aus Zellen von ca. 5 à 6 μ, ist also viel kleiner wie die gewöhnliche Presshefe, welche 8 μ misst; sie vergärt Glukose, Laevulose und Rohrzucker sehr energisch zu Alkohol und Kohlensäure und erzeugt aus den beiden ersten Zuckern dazu etwas Essigäther. Sie vergärt und assimiliert Maltose, Dextrin

und Stärke gar nicht. Bei der Gelatinekultur spaltet sie sich, wie viele andere Hefearten, in drei morphologische, in der Form der Kolonieen sehr verschiedene Varietäten, wovon eine aus der gewöhnlichen ellipsoidischen, eine andere aus langfadenförmigen Zellen besteht, welche sich aber, eben wie die dritte Zwischenform, physiologisch identisch verhalten. Andere noch weniger spezialisierte Hefearten, welche ebenfalls dienlich sein können, sind die Laktosehefen, welche Glukose assimilieren, Maltose, Dextrin und Stärke aber nicht. Zwar gären und wachsen diese letzteren Hefen auch mit Laktose und Rohrzucker, doch fehlen diese Zuckerarten in den bei der Glukaseuntersuchung in Betracht kommenden Präparaten. Von diesen Laktosehefen sind die in den Kefyrkörnern vorkommenden als S a c c h a r o m y c e s K e f y r bezeichnete Art, sowie die in holländischem Käse allgemeine Form S. T y r o c o l a [1]) leicht zu isolieren und sehr geeignet, als Reaktive auf Glukose, bei Gegenwart von Maltose, verwendet zu werden.

Da alle die genannten Hefearten ihren Kohlenstoffbedarf nur einem assimilationsfähigen Kohlehydrat oder, in gewissen Fällen, einem Acetat und Glycerin entnehmen können, nicht dagegen an Peptonen und Amiden, so ist man in der Wahl der Stickstoffquelle, welche, in Vereinigung mit dem Kohlehydrate, Wachstum veranlassen soll, frei, und kann, je nach Umständen, dafür Pepton, Asparagin oder ein Ammonsalz verwenden. Jedoch muss ich bemerken, dass die für feste Substrate giltigen Regeln nicht immer unverändert auf Flüssigkeiten angewendet werden können. Der Kahmpilz, in Gelatine eingeschlossen, erzeugt keine Invertase und kann darin auch nicht auf Rohrzucker reagieren, thut dieses dagegen wohl in flüssigen Nährmedien. Wenn dieser, mir früher unbekannte Umstand, für den gegenwärtigen Zweck gleichgiltig ist, so ist dieses nicht der Fall in Bezug auf die folgende, mir erst neuerdings ganz klar gewordene Eigentümlichkeit des Kahmpilzes. Dieser Organismus vermag, wenn in Gelatine eingeschlossen, Maltose unter keinem Umstande zu assimilieren, welche Stickstoffquelle daneben auch zur Disposition gestellt wird. In flüssigen Nährmedien ist das Verhalten desselben jedoch in einem bestimmten Falle davon abweichend. Denn wenn der Kahmpilz einerseits Maltose auch in flüssigen Medien nicht assimiliert, wenn Pepton, Asparagin, Ammonsalz oder ein Gemisch dieser Körper als Stickstoffquelle dargeboten wird, so findet andererseits Maltoseassimilation faktisch statt, wenn durch den Maischprozess gebildete M a l z p e p t o n e, selbst in gekochtem Zustande, dargeboten werden. Der Kahmpilz kann deshalb nicht, wie ich früher meinte [2]), zur quantitativen Glukosebestimmung in Würzen verwendet werden. Bei dem Gebrauche des Kahmpilzes für die Glukoseuntersuchung vermittelst der auxanographischen Methode kann daraus bei genügender Vorsicht jedoch niemals eine Fehlerquelle entstehen. Uebrigens trifft der berichtete Umstand nicht zu für S a c c h a r o m y c e s a p i c u l a t u s und S. f r a g r a n s, welche Maltose unter keinem Umstand assimilieren und also in beiderlei Hinsicht dienlich sein können.

Die Versuchsanstellung geschieht nun, wie folgt:

Es wird eine 10-proz. Lösung von Gelatine in Leitungswasser angefertigt und dazu $^1/_{20}$ Proz. Monokaliumphosphat und 5 Proz. Maltose oder Dextrin oder $^1/_2$ Proz. lösliche Stärke, und $^1/_{20}$ Proz. Chlorammon (nämlich bei der Verwendung von Kahm-

[1]) Centralblatt für Bakteriologie. Bd. VI. 1880. p. 44

[2]) Zur Biologie des Kahmpilzes. (Centralbl. f. Bakteriol Bd XI 18[illegible]

pilz) oder ¼ Asparagin oder 1 Proz. Pepton siccum zugesetzt (nämlich wenn S. fragrans, S. apiculatus oder S. Kefyr verwendet werden). Es wird sterilisiert, abgekühlt und vor dem Erstarren eine sehr grosse Anzahl von Zellen von irgend einer der oben genannten Hefearten untergemischt. Es ist am besten, dieses in einem kleinen Kochkölbchen auszuführen und die Hefe mit einem starken Platinfaden im Halse des Kölbchens an der Glaswand zu zerreiben und mit der noch flüssigen Nährgelatine innig zu vermischen. Nach längerem und vorsichtigem Schaukeln in der Hand, wobei der Schaumbildung gänzlich vorgebeugt werden muss, giesst man das Ganze in eine sterilisierte Glasdose mit gut geebnetem, aussen poliertem Boden und lässt erstarren. Die dabei erhaltene Schicht muss vollständig durchsichtig sein oder, im Falle lösliche Stärke hinzugesetzt war, welche sich beim Abkühlen in feinen Tröpfchen abscheidet, nur eine schwache Trübung zeigen. Die Mikroorganismen dürfen nicht in solcher Menge vorkommen, dass sie schon vor dem Eintritte des Wachstums sichtbar sind.

Aus dem Angeführten geht hervor, dass die Hefe mit der dargebotenen Nahrung überhaupt nicht wachsen kann, denn die Kohlenstoffquelle ist in einem nicht für Assimilation geeigneten Zustande gegenwärtig. Wenn also durch irgend eine Ursache die Maltose, das Dextrin oder die Stärke in Glukose übergehen, so wird sofort Wachstum eintreten und die bisher durchsichtige Gelatineplatte wird trübe und undurchsichtig werden infolge der Kolonieenbildung aus den vereinzelten Keimen. Es ist nun die Aufgabe, diese Trübung lokal herbeizuführen durch das Auflegen von Glukasepräparaten oder von glukasehaltigen Substanzen, welche die Umwandlung der Maltose, des Dextrins oder der Stärke in Glukose bewirken, wodurch auf dem durchsichtigen Boden trübe Felder, »Auxanogramme«, der betreffenden Hefen zum Vorscheine kommen. Es ist von besonderer Wichtigkeit, hierbei folgendes wohl zu beachten:

Die Glukase ist, ganz im Gegensatze zu der Malzdiastase, ein Enzym, welches nur sehr schwierig löslich und äusserst wenig diffusionsfähig ist. Experimentiert man mit Maltose, so diffundiert dieser Körper nach den auf der Oberfläche der Gelatineplatte liegenden glukasehaltigen Teilchen und kehrt von dort als Glukose zurück, um in der nächsten Umgebung durch die Hefezellen assimiliert zu werden und zu deren Ausbildung zu Kolonieen Veranlassung zu geben. Jede dieser Kolonieen bildet dann aber ein starkes Attraktioncentrum für weiter erzeugte Glukose, so dass die entstehenden Auxanogramme die Neigung besitzen, sich aus vereinzelten Kolonieengruppen zusammenzusetzen, welche sich um die Teilchen des auf der Platte liegenden glukasehaltigen Präparates als Centrum gruppieren. Ganz anders also wie bei der Malzdiastase, welche als leicht löslicher Körper an sich ein ausgedehntes Diffusionsfeld erzeugt und, im Falle darin Wachstum von Mikroorganismen stattfindet [1]), ein wenigstens ebenso weit ausgedehntes Auxanogramm von gleichmässiger Trübung hervorruft. Findet die Versuchsanstellung mit löslicher Stärke statt, so ist das Kolonieenwachstum um die Glukaseteilchen noch beschränkter, weil die Stärke noch weniger diffusionsfähig ist wie die Glukase selbst und deshalb den Enzymteilchen nicht wie die

---

[1]) Dieses findet z. B. statt, wenn in dem beschriebenen »Stärkeboden« irgend eine echte Maltosehefe (S. cerevisiae, S. ellipsoideus, S. minor etc.) vorkommt, und die Stärke lokal durch Malzdiastase oder Speichel etc. in Maltose verwandelt wird.

Maltose zuströmen kann. Bei dieser Versuchsanstellung ist es darum ratsam, das enzymhaltige Präparat sehr fein zu pulverisieren und das Pulver auf einem nicht zu eng begrenzten Fleck auf die Platte zu streuen. Man erreicht dann auch noch den beiläufigen Vorteil, dass wenn sich einzelne Bakterien in dem Glukosepräparat vorfinden sollten[1]), diese so weit aus einander gestreut zur Entwicklung gelangen, dass das Versuchsergebnis dadurch nicht getrübt wird.

Bei der Verwendung von Saccharomyces apiculatus bleiben die Auxanogramme etwas durchsichtiger, wie wenn diese aus S. fragrans, S. Mycoderma, S. Kefyr oder S. Tyrocola entstehen. Am augenfälligsten werden dieselben bei der Verwendung des Kahmpilzes, welcher auch durch sein schnelles und leichtes Wachstum ausgezeichnet ist. Auch ist letzterer Pilz in manchen anderen Hinsichten für die Untersuchung auf Glukose sehr geeignet, wenn man sich nur bewusst bleibt, dass, wie oben angegeben, dabei durch die Gegenwart gewisser nicht genau bekannter stickstoffhaltiger Körper, welche die Maltose assimilationsfähig machen, eine Fehlerquelle möglich ist, welche für Saccharomyces fragrans, S. apiculatus u. s. w. nicht existiert. Hat man sich jedoch einmal genau angesehen, wie der Kahmpilz sich Glukose gegenüber bei der Auxanogrammbildung verhält, so wird man auch mit diesem Organismus nicht leicht irregeführt werden. Ueberdies wurde schon hervorgehoben, dass die eigentümlichen Körper, welche, ohne Glukase zu sein, die Maltose assimilationsfähig machen, erst bei dem Maischprozess aus Getreide entstehen, dagegen nicht in frischem Getreide und den übrigen mir bekannt gewordenen Samen vorkommen. Und da diese Körper nun noch überdies gekocht werden können, ohne ihr spezifisches Vermögen einzubüssen, während Glukase schon bei 70° C vernichtet wird[2]), so kann man, bei einiger Vorsicht, den so leicht zu erhaltenden und zu handhabenden Kahmpilz mit vollständiger Sicherheit für den Nachweis von Glukase verwenden.

Kapitel II.

Die verschiedenen Amylasearten.

In seinem berühmten Buche über das Bier sagt G. J. Mulder[3]), dass es vielleicht 25 verschiedene Amylasearten giebt. Wenn Mulder für diese Ansicht auch keine genügende Begründung giebt, so lässt sich nicht verkennen, dass er mit den späteren Erfahrungen in guter Uebereinstimmung ist. Denn sobald man die Amylasen verschiedener Herkunft genau studiert in Bezug auf ihre Produkte bei der Stärkezersetzung, ferner in Bezug auf die Beeinflussung dieses Vorganges durch Temperatur, Säuren und Alkalien, schliesslich auf ihre Diffusionsgeschwindigkeit, so findet man eine überraschende Vielseitigkeit, welche nur aus der Existenz mehrerer Amylasearten erklärt werden kann.

---

[1]) Meine aus ungekeimten Maiskörnern dargestellten Glukasepräparate geben auf den Maltose-Gelatineplatten überhaupt keine Kolonieen von Mikrobien.

[2]) Aus Hefe lässt sich eine Glukaseart abscheiden, welche schon bei 55° C vernichtet wird, und welche ich Zymoglukase nennen will.

[3]) Het bier scheikundig beschouwd. Rotterdam 1857. pag. 177.

Wie gesagt, war Mulder's Ansicht jedoch nicht mehr wie eine Ahnung des Thatbestandes, und wir müssen uns bei jenen geduldigen Beobachtern des amylolytischen Prozesses, Dubrunfaut und Cuisinier im Jahre 1881 umsehen, um die ersten positiven Angaben über das Vorkommen zweier Enzyme im Gerstenmalze zu finden [1]. Auch bei diesen Forschern ist die Frage jedoch noch vollständig in ein, sozusagen industrielles Gewand gekleidet und erst Wysman (l. c.) ist es gelungen, die »Zweienzymtheorie« der Malzamylase zu einer feststehenden und für jedermann leicht zugänglichen Thatsache zu erheben, wenn auch seine Erklärungsweise der Beobachtungsresultate einer Abänderung bedürftig ist.

Meine, in Bezug der näheren Interpretation der Zweienzymtheorie der Gerstenmalzdiastase durch fortgesetzte Untersuchungen erhaltene, und von Wysman's Auffassung etwas abweichende Ansicht mag hier kurz erwähnt werden, weil ich dadurch genötigt war, für das zweite Enzym des Malzes nicht das von Wysman, nach Cuisinier's Vorgange gewählte Wort »Dextrinase« zu verwenden, sondern dafür den Namen »Granulase« einzuführen.

Nach Wysman's Auffassung besteht die Gerstenmalzamylase aus zwei Enzymen, Maltase, welche aus Stärke Maltose und Erythrodextrin [2] erzeugt, und Dextrinase, welche aus Stärkegranulose nur Maltodextrin produzieren sollte. Nun finde ich, dass Wysman's Ansicht bezüglich der Maltase ohne Bedenken richtig ist, allein, dass die Dextrinase, welche er durch Erhitzen von Malzamylase während 10 Minuten auf 78° C erhielt, ein Kunstprodukt ist, welches in dem lebendem Malze nicht vorkommt. Die Sache verhält sich wie folgt. Wysman glaubte gefunden zu haben, dass im keimenden Malze aus dem Scutellum des Keimlings Dextrinase und Maltase in das Endosperm hinein diffundieren. Das ist aber nicht richtig, aus dem Scutellum strömt (abgesehen von einer Spur Glukase), eben wie aus den Keimlingen anderer Mono- und Dikotylen mit mehligem Endosperm, Granulase, d. h. ein Körper, welcher aus Granulose neben Achroodextrin auch Maltose erzeugt. Wird nun das Gemisch von Maltase und Granulase, wie es sich im Malz vorfindet, oberhalb 70° C erhitzt, so stirbt die Maltase ganz ab, da diese Körper schon bei 55° C durch die Temperatur geschädigt wird, und ferner unterliegt die Granulase einer chemischen Umwandlung, welche darin besteht, dass dessen Vermögen, aus Granulose Maltose zu bilden, stark beeinträchtigt wird, während die Eigenschaft der Dextrinproduktion nicht verändert wird. Es ist nun allerdings bemerkenswert, dass man aus anderen Amylasearten, wie Ptyalin, Maismalzdiastase, Buchweizendiastase etc. durch Erhitzen nur eine viel weniger ausgesprochene »Dextrinase« erhalten kann, d. h. darin durch Erhitzen das Vermögen der Maltoseerzeugung viel weniger vollkommen vernichtet, das beweist aber nur, dass die Gerstenmalzgranulase chemisch verschieden ist von der Maismalzgranulase etc., beweist jedoch nichts für deren Zusammenstellung als Gemisch von Maltase und Dextrinase.

---

[1]) Dubrunfaut, Mémoire sur la saccharification des fécules. Paris 1882. p. 140. Cuisinier in Scheibler's neue Zeitschr. f. Rübenzuckerindustrie. Bd. XVI. 1886. p. 30.

[2]) Wysman's »Erythrogranulose« ist identisch mit Erythrodextrin.

[3]) Nach der hier befolgten Nomenklatur ist also Gerstenmalzdiastase = Maltase + Granulase, Maismalzdiastase = Glukase + Granulase, Buchweizendiastase ebenso = Glukase + Granulase. Hierbei sind aber die Glukasen unter sich ebenso wenig völlig identisch wie die Granulasen.

Mit Wysman's Entdeckung der Maltase als ein gut zu charakterisierendes Enzym des Gerstenmalzes, neben der Granulase desselben, war unsere Kenntnis des Gehaltes an Amylasen im Getreide im allgemeinen jedoch noch nicht zum Abschlusse gebracht. Denn erstens fand ich, wie eben gesagt, dass die Granulase des Maismalzes verschieden ist von der Granulase (und natürlich auch von der Maltase) des Gerstenmalzes, des Weizens und des Roggens, und zweitens zeigte Geduld, nach den vorläufigen Angaben Cuisinier's, wie wir weiter sehen werden, dass sich im ungekeimten Mais ein besonderes Enzym vorfindet, die Glukase, deren Haupteigenschaft ist, die Maltose in Glukose zu verwandeln.

Die Hypothese, welche sich bei Verflüssigungsversuchen von Stärkekleister mit Malz unwillkürlich aufdrängt, nämlich dass die Ueberführung des unlöslichen Kleisters in lösbare Granulose auf ein besonderes, nur verflüssigend wirkendes und lösliche Stärke erzeugendes Enzym beruhen könne, hat sich bei genauer Prüfung nicht als berechtigt ergeben, denn es lässt sich erweisen, dass diese Verflüssigung eine Funktion der Granulase ist, und in sehr geringem Grade auch der Maltase und Glukase zukommt [1]. Es dürfte deshalb erscheinen, dass andere stärkezerlegende Enzyme, wie die hier angeführten, im Getreide sowie bei den Gramineen überhaupt nicht vorkommen. Sicher ist dieses allerdings nicht, denn das Verhalten des Hafers deutet durch eigentümliche Erscheinungen auf ein besonderes, der Granulase der Gerste zwar nahestehendes, davon jedoch vielfach abweichendes Enzym. Uebrigens ist es auch noch zweifelhaft, ob die Glukase als ein chemischer Körper aufgefasst werden muss, wahrscheinlich existieren davon mehrere Modifikationen, welche selbst in einem und demselben Korne, wie Mais, Sorgho oder Buchweizen vorkommen dürften. Sehen wir vorläufig aber von diesen kleineren Verschiedenheiten ab und versuchen wir die vorgeführten drei Hauptarten der natürlichen Amylasen übersichtlich zusammenzustellen.

Es ergiebt sich, dass eine solche Zusammenstellung zu erhalten ist, wenn man die Erzeugungsprodukte, welche jede Amylaseart aus verkleisterter Stärkegranulose sowie aus den Abbauprodukten der letzteren erzeugt, dabei als Basis der Einteilung annimmt. Diese Produkte sind vier in Zahl, nämlich Erythrodextrin, Maltodextrin oder Isomaltose, Maltose und Glukose.

Da hierbei zunächst keine Rücksicht genommen wird auf die übrigen sich nicht mit Jod färbenden Amylasedextrinen, welche mit dem Maltodextrin zur Gruppe der Achroodextrinen gebracht werden können, ist es notwendig, zu erörtern, welche Stellung ich bezüglich der Dextrinfrage überhaupt einzunehmen wünsche. Nach zahlreichen Versuchen habe ich gefunden, dass die Erscheinungen der Dextrinbildungen aus verkleisterter Stärke durch Amylase [2]) sich am besten folgenderweise zum Ausdruck bringen lassen.

Es giebt drei Dextringattungen, nämlich das Erythrodextrin, das Maltodextrin oder die Isomaltose und das Leukodextrin. Ersteres färbt sich mit Jod violett-rot, die beiden letzteren bleiben damit farblos und können darum Achroodextrine genannt werden. Maltodextrin oder Isomaltose ist ein einheitlicher Körper,

[1]) Gekochter Stärkekleister ist durchaus keine Losung, sondern besteht nur aus den stark gequollenen und hyalin gewordenen, jedoch leicht sichtbaren Stärkekornern, was man direkt bemerkt, wenn man eine Spur Kartoffelstärke in einem Reagentienrohrchen in viel Wasser aufkocht. Durch Jod wird die Erscheinung dann noch deutlicher.

[2]) Ueber die Säuredextrine kann ich kein bestimmtes Urteil abgeben.

welcher leicht durch gewisse Amylasearten in Maltose übergeführt werden kann. Dasselbe gilt von dem Erythrodextrin, welches dabei aber zuvor in Achroodextrin umgewandelt wird.

Leukodextrin ist dagegen ein Kollektivname von folgender Bedeutung. Wenn man auf verkleisterte Stärke Malzamylase während kurzer Zeit einwirken lässt, so findet zunächst eine vollständige Verflüssigung statt und die Lösung wird mit Jod tiefblau. Lässt man nun die Amylase so lange einwirken, bis die Lösung sich mit Jod nicht mehr färbt, und präzipitiert dann mit nicht allzustarkem Alkohol, z. B. Alkohol von 60° in Uebermass, so ist es möglich, ein Gemisch von Körpern von dem gelöst bleibenden Maltodextrin und der Maltose zu trennen, ein Gemisch, welches ich Leukodextrin nenne und welches sofort als schneeflockiges Präzipitat ausfällt. Erst bei viel höherer Konzentration des Alkohols erhält man das Maltodextrin als syrupartige Tropfen, welche sich an die Glaswand absetzen [1].

Dieses Leukodextrin ist jedoch für die Einwirkung der Amylase, wenn diese nur lange genug fortdauert, zugänglich, und kann dabei schliesslich auch vollständig in Maltose übergehen. Nach der Diffusionsgeschwindigkeit des Leukodextrins in Gelatineplatten zu urteilen, finden sich darin Körper von sehr verschiedener Molekulargrösse. Diejenigen mit den grössten Molekülen diffundieren überhaupt nicht, was ebenfalls für Stärkegranulose zutrifft; die am weitesten diffundierten stimmen in Bezug auf den zurückgelegten Weg mit dem Erythrodextrin nahezu überein, und dürften auch nach der Molekulargrösse davon wenig verschieden sein.

Die Leukodextrine entstehen durch Amylolyse sowohl aus Stärkekleister wie aus frischer Stärke, und ihre vollständige Entfernung aus Granulose, Erythrodextrin und Maltodextrin scheint bisher noch nicht gelungen.

Mit Lintner's neuester Untersuchung, worin die Abbauprodukte der Stärke als Osazone bestimmt sind, ist unsere Auffassung ziemlich gut im Einklang [2]. Lintner hat jedoch gar keine Rechnung gehalten mit dem am meisten prinzipiellen Fortschritte unserer Kenntnis der diastatischen Prozesse, nämlich mit Wysman's Entdeckung der Maltase.

Es darf noch bemerkt werden, dass unsere Betrachtung über die Leukodextrine mit der ursprünglichen Ansicht von Carl Nägeli, nach welcher das Stärkekorn aus einem Gemische von Stärkegranulose und Stärkecellulose aufgebaut ist [3], gut übereinstimmt. Es können nämlich das Erythrodextrin, das Maltodextrin und die Maltose ungezwungen auf Nägeli's Stärkegranulose, die Leukodextrine dagegen auf seine Stärkecellulose zurückgeführt werden. Nach dieser Vorstellung muss in einer Stärkelösung, sofort nach der Verflüssigung durch Malz, ein aus der Stärkecellulose hervorgehender Stoff gegenwärtig sein, welcher durch Jod nicht gefärbt wird und Diastase gegenüber resistenter ist, wie die Stärkegranulose, was gut stimmt mit den Erfahrungen der Praxis. Dass gewisse chemische Eingriffe imstande sind, die ursprüngliche Stärkecellulose mehr oder weniger vollständig in Stärkegranulose umzuwandeln, scheint mir mit der angeführten Betrachtung nicht im Streite.

Um mit meinen Versuchen gut in Uebereinstimmung zu bleiben, will ich von dieser Ansicht insoweit Gebrauch machen, dass ich unter Stärkegranulose nur denjenigen

---

1) Mit stärkerem Alkohol präzipitiert schliesslich auch Maltose.
2) Berichte der Deutschen chem. Gesellsch. Bd. XXVI 1893, p. 2533.
3) Die Stärkekörner, p. [illegible] ff. Zürich 1858.

Teil einer Stärkelösung verstehe, welcher durch Malzdiastase in kurzer Zeit glatt in Erythrodextrin, Maltodextrin und Maltose übergeführt wird. Die Leukodextrinen sind für die Charakteristik der Amylasen vorläufig ungeeignet, weshalb ich dabei nicht länger verweilen will.

Stellen wir nun die Amylasegattungen nach dem Gesichtspunkte der dadurch aus Stärkegranulose erzeugten Produkte tabellarisch zusammen, so erhalten wir folgende Uebersicht:

A.

Amylasegattungen	Umwandlungsprodukte aus Stärkegranulose			
	Erythrodextrin	Maltodextrin	Maltose	Glukose
I. Glukase . . .	—	—?	—?	+
II. Maltase . .	—	—	—	—
III. Granulase .	—	+?	—	—

In Bezug auf den in dieser und den folgenden Tabellen gebrauchten Namen Granulase will ich noch Folgendes bemerken: Wie schon im Vorhergehenden angegeben, verstehe ich unter Granulase eine Reihe von Amylasearten, welche zur Zeit nur schwierig von einander zu unterscheiden sind, obschon dieselben durchaus nicht identisch sind. Die Hauptarten davon, welche ich untersucht habe, sind:

a) Ptyalin und Pankreasgranulase, welche unter sich wohl identisch sind und als »Alkaligranulasen« den folgenden als »Säuregranulasen« zu bezeichnenden Arten gegenübergestellt werden können [1]).

b) Die Gersten-, Weizen- und Roggenkeimlinggranulase, welche sich auch in der Eiweissschicht des Endosperms dieser Körper vorfindet (wobei dann die Malzdiastase = Maltase — Malzgranulase ist).

c) Buchweizengranulase, wohl identisch mit der Dikotylengranulase im allgemeinen, wie in keimenden Kartoffeln, in den Samenlappen der meisten stärkeführenden Dikotylenkeimlinge, der Silenenfrüchte u. s. w.

d) Granulobactergranulase (bei Granulobacter butylicum und G. saccharobutylicum).

e) Maismalzgranulase.

Die Maltase in dem hier gebrauchten Sinne findet sich, ausser im Endosperm von Weizen, Gerste und Roggen und vielen anderen Gramineen, neben Granulase auch in den verschiedensten Teilen von Vicia Faba und Pisum sativum, in den Fruchtknotenwandungen von Phaseolus und Cytisus, in den Blattstielen von Robinia, in den Knollen von Sagittaria sagittaefolia und anderswo.

Aber kehren wir nach dieser Detaillierung zu unserer Haupteinteilung der Amylasen zurück.

Stellen wir auf eine ähnliche Weise, wie in Tabelle I die Umwandlungsprodukte aus Granulose dargestellt worden sind, die weiteren Abbaustufen jener Produkte zusammen, nämlich resp. von Erythrodextrin (Tab. B), von Maltodextrin (Tab. C) und von Maltose (Tab. D), so bekommen wir die nachfolgenden Daten

[1]) Speichel- und Pankreasdiastase enthalten neben Granulase Spuren von Glukase.

B.

Amylasegattungen	Umwandlungsprodukte aus Erythrodextrin		
	Maltodextrin	Maltose	Glukose
I. Glukase	+v	+v	+
II. Maltase	—	—	—
III. Granulase	+v	+	—

C. D.

Amylasegattungen	Umwandlungsprodukte aus Maltodextrin		Umwandlungsprodukte aus Maltose
	Maltose	Glukose	Glukose
I. Glukase	+v	+	+
II. Maltase	+	—	—
III. Granulase	+	—	—

In allen diesen Tabellen bedeutet das Zeichen +, dass der betreffende Körper wohl entsteht, das Zeichen —, dass dieses nicht der Fall ist. Der Buchstabe *v*, dass der betreffende Körper vorübergehend entsteht, um dann weiter zersetzt zu werden. Wir sehen also, dass Glukase aus Stärkekleister vorübergehend Maltodextrin, bleibend Glukose, aber kein Erythrodextrin und keine Maltose erzeugt (Tab. A); ferner dass Glukase aus Erythrodextrin vorübergehend Maltodextrin und Maltose, bleibend Glukose erzeugt (Tab. B); dann dass Glukase aus Maltodextrin vorübergehend Maltose und daraus Glukose erzeugt (Tab. C), und endlich, dass Glukase Maltose in Glukose verwandelt (Tab. D). Für die anderen Enzyme lassen sich die Umwandlungsprodukte auf dieselbe Weise aus den Tabellen ablesen.

Um alle Zweideutigkeit zu entfernen, muss ich nun noch einmal auf die Leukodextrine zurückkommen. Wie diese sich in Bezug auf die hier genannten Enzyme verhalten, ist vorläufig unbekannt. Wichtig ist es aber, zu bemerken, dass auch diese Körper unter Umständen völlig in Zucker übergehen können. Es ist sicher, dass dieses bei sehr schwach alkalischer oder neutraler Reaktion durch Ptyalin oder Pankreasdiastase geschehen kann, wobei hauptsächlich Maltose, nur spurenweise Glukose entsteht, und ferner, dass dieselben bei neutraler oder sehr schwach saurer Reaktion durch Glukase schliesslich in Glukose umgewandelt werden. Vieles deutet auch darauf hin, dass sie auch von Maltase und Granulase angegriffen werden, wodurch sie sich als noch labilere Körper ergeben, wie z. B. das Erythrodextrin, welches unter den gewöhnlichen Versuchsbedingungen nicht von Maltase angegriffen wird[1]). Das Eigentümliche bei den Umwandlungen des Leukodextrins scheint besonders in der Langsamkeit zu bestehen, womit dieser Prozess verläuft, verglichen mit der schnellen Umwandlung, welche die Granulose durch die Amylasen erfährt. Ich brauche wohl nicht zu sagen, dass in den Leukodextrinen die Hauptursachen gesucht werden müssen bezüglich der Unsicherheit, welche so vielen Untersuchungen über die Amylolyse anklebt, und dass es eine wichtige Aufgabe für die physiologische Chemie ist, eben auf

[1]) Unter noch nicht näher erforschten Umständen vermag Maltase Erythrodextrin weiter abzubauen.

diese Körper neues Licht zu werfen. Ob auch sehr langsame Umwandlungen in anderem Sinne, wie in den Tabellen verzeichnet, durch die dort angeführten Amylasen stattfinden, ohne dass die Leukodextrinen dabei im Spiele sind, weiss ich nicht sicher, doch halte ich es für wahrscheinlich. Der für diese verschiedenen Prozesse gebrauchte Zeitaufwand ist aber sicher so gänzlich verschieden von den für die Hauptumsetzungen benutzten, dass die in den Tabellen gegebenen Zeichen ihre volle Berechtigung haben und jedenfalls für die meisten Laboratoriumversuche das Schema der Umwandlung gut angeben. Ich habe darum auch auf diesen Seiten, wo ich über die Glukase spreche, von diesen sozusagen säkularen Vorgängen abgesehen. Ich bin mir wohl bewusst, dass eine der merkwürdigsten Seiten der Enzymwirkungen dadurch ausser Betrachtung bleibt, doch erscheint eine solche Behandlungsweise auf diesem noch so wenig aufgeklärten Arbeitsfelde durchaus notwendig.

Am Schlusse dieses Kapitels muss ich noch besonders betonen, obschon das vorgehend schon erörtert wurde, dass die Amylasearten an ihren natürlichen Entstehungsorten gewöhnlich nicht rein auftreten, sondern gemischt mit anderen Amylasearten, und dass die Trennung derselben durch die gewöhnlichen chemischen Hilfsmittel nur unvollkommen möglich ist. So findet sich im Speichel neben dem Ptyalin ein wenig Glukase: — dasselbe gilt bezüglich der Pankreasflüssigkeit; — im Endosperm der ungekeimten Gerste findet sich viel Maltase mit ganz geringen Spuren Glukase und etwas Granulase; — im Gerstenmalze ein quantitativ veränderliches Gemisch von Granulase, Maltase und Glukase, letzteren Körper jedoch nur in äusserst geringer Menge; — in den Vegetationsorganen von Vicia Faba und anderen Papilionaceen, ein Gemisch von Granulase und Maltase; — ebenso in den Knollen von Sagittaria sagittaefolia; — in den keimenden Samen von Mirabilis jalapa, von Buchweizen, sowie im Maismalze ein Gemisch von Glukase und Granulase. Es ist deutlich, dass diese Mischungsverhältnisse die amylolytischen Prozesse ausserordentlich verwickeln und die Beurteilung der sehr langsamen Umsetzungen ganz besonders erschweren. Die Diffusionsmethode ist gut geeignet, viele der subtilsten Fragen in dieser Beziehung einfach und klar zu beantworten oder, in anderen Fällen, zu einer nützlichen Hypothese oder zu richtiger Fragstellung Veranlassung zu geben.

Ich wünsche nun diese allgemeine Besprechung abzubrechen, nicht aus Mangel an Untersuchungsergebnissen, sondern weil für unseren eigentlichen Gegenstand darüber genug gesagt ward, und ich will nun zur Darstellung der bei der Glukase erhaltenen Resultate übergehen.

Kapitel III.

Die Glukase.

1. Entdeckung der Glukase durch Cuisinier.

Im Jahre 1885 hat Léon Cuisinier sich ein Verfahren patentieren lassen zur Darstellung von »Cerealose«, das ist ein an Glukose sehr reiches Präparat aus Getreidemehl vermittelst eines neuen Enzyms, welches er Glukase genannt hat. Zu diesem Zwecke wird das Mehl nach bekannten Methoden durch Diastase saccharifiziert,

daraus wird ein Maltosesyrup bereitet und dieser der Wirkung der Glukase anheimgestellt, wodurch die Maltose sich in Glukose verwandelt. Er verwendet dazu einen kalten Auszug von eingeweichten, ungekeimten, gequetschten Maiskörnern, worin sich das neue Enzym vorfindet. Er beschreibt sein Verfahren wie folgt [1]):

»Das Brevet bezweckt die Darstellung einer zuckerartigen Substanz, die Cerealose, welche mit der Rohglukose nahe übereinstimmt. Die Cerealose ist das Produkt der Verzuckerung des Getreides durch die Wirkung einer neuen Diastaseart, die Glukase, welche der Patentnehmer entdeckt hat sowohl in eingeweichten Getreidekörnern, wie in deren Einweichwässern.

Die Glukase wirkt nicht allein: um Stärke zu verzuckern, wird die Gegenwart von etwas Malz gefordert, dessen verflüssigende Wirkung der ausschliesslich verzuckernden Wirkung der Glukase kompletiert [2]).

Man verfährt jedoch bei der Cerealosebereitung derweise, dass der Bildung von Kleister vorgebeugt wird; die rohe Stärke wird höchstens bis nahe an die Verkleisterungstemperatur erhitzt und dann der Einwirkung des neuen Enzyms anheimgestellt. Immer ist die Folge davon, dass die behandelten Substanzen länger maceriert werden müssen, jedoch ist diese längere Dauer der Einwirkung unumgänglich zur Sicherung des Resultates.

Wird der Mais als Beispiel gewählt, so sind die Operationen für die Fabrikation der Cerealose die folgenden:

1. Einweichung der Körner in kaltem Wasser während zwei oder drei Tagen.

2. Zerquetschen der Körner und Behandlung dieses Mehles mit lauem Wasser.

3. Schnelle Erhitzung der flüssigen Masse bis auf 67° C, unter Hinzufügung von im Maximum 10 kg Grünmalz auf 100 kg trocken verarbeiteten Mais.

4. Schnelle Abkühlung auf 62 ° C, aktiviert durch Hinzufügung des kalten Wassers an die Maische, womit die Körner eingeweicht sind.

5. Maceration während 108 Stunden bei 62° C.

Die Maische soll 20 à 25 kg Mais pro Hektoliter Maischraum enthalten; in diesem Zustande verändert sich die Masse bei 62° C nur schwierig; wünscht man sich aber gegen alle schädlichen Einflüsse, z. B. während der warmen Saison, zu sichern, so würde es genügen, die Maische mit Chloroform oder mit Chlormethyl, nach bekannten Verfahren bereitet, zu vermischen.

6. Ausscheidung der Treber in Filterpressen.

Man wird dabei ein sehr leichtes Filtrieren bemerken; dieses erklärt sich durch die Abwesenheit des Kleisters während der verschiedenen Phasen der Fabrikation.

Die Treber enthalten noch Stärke, welche daraus extrahiert wird, durch Einwirkung von Malz auf die unter Druck gekochte Masse, nach den gewöhnlichen Prinzipien der Fabrikation des Maltosesyrups.

7. Konzentration des Saftes auf 40° Baumé und Krystallisation durch Hineinwerfen eines Stückes gewöhnlicher Glukose. Es entsteht dann in wenigen Stunden ein halbfester Cerealosesyrup mit 28 Proz. Wasser diese angenehm süsse Masse ist

[1]) Brevet No. 171058, pris le 30 Octobre 1885 par le sieur Léon Cuisinier pour »Une nouvelle matière sucrée diastasique la Céréalose et pour sa fabrication«. (La sucrerie indigène et coloniale. T. XXVII. 2 Mars 1886. p. 241.)

[2]) Diese Auffassung Cuisinier's ist, wie schon angegeben, nicht völlig in Uebereinstimmung mit den Thatsachen.

beinahe ausschliesslich gärungsfähiger Zucker. Cerealosewurzen vergaren vollständig wegen deren Reichtum an Hefenahrung und sie empfehlen sich durch ihre Zusammensetzung, um den Alkoholreichtum des Bieres und anderer alkoholischen Flüssigkeiten zu erhöhen.«

Von einem sehr reichen, nach diesem Verfahren dargestellten Syrup wurde die Zusammensetzung wie folgt gefunden:

Wasser . . .	18,00	Proz.
Glukose . . .	60,15	„
Maltose . . .	1,40	„
Dextrin etc.	20,45	„

In demselben Journal, worin das Patent aufgenommen ist, giebt Cuisinier die folgende nähere Begründung seiner Entdeckung [1]):

»Die so oft beschriebenen Eigenschaften der Malzdiastase genügen nicht zur Erklärung der Stärkeumsetzung in den Pflanzen und besonders in den Samen; Thatsache ist, dass, wenn man den löslichen Teil von Gersten- oder Maismehl analysiert, der darin vorkommende Zucker der Hauptsache nach aus Dextrose besteht.

Wie soll man nun, wenn die Bildung dieses Zuckers der Wirksamkeit der Diastase des Kornes zugeschrieben wird, die Gegenwart von Glukose erklären, aus der wohlbekannten Eigenschaft dieser Diastase die Stärke in Maltose und Dextrin umzuwandeln? Diese Frage haben wir uns seit langer Zeit gestellt.

Entweder muss man annehmen, dass die Maltase auf nicht verkleisterte Stärke anders einwirkt wie auf verkleisterte, oder dass in den lebenden Samen noch ein besonderes Enzym vorkommt, welches imstande ist, Glukose zu erzeugen. Die Untersuchungsresultate haben uns von der Richtigkeit der letztgenannten Ansicht überzeugt.

Wenn man, unter Entfernung der Ursachen für Veränderung durch organisierte Fermente, gequetschtes und in Wasser verteiltes Grünmalz unterhalb der Verkleisterungstemperatur, nämlich bei 40° à 50° C. sich selbst überlässt, so wird man finden, dass eine allmähliche Lösung der Stärke stattfindet, und dass, wenn die Umsetzung vollständig ist, bei der Analyse in der Flüssigkeit nur Dextrose gefunden wird [2]).

Bei diesem Versuche ist die Verflüssigung der Stärke sehr viel langsamer, als wenn man vorher verkleistert, und dann Malz einwirken lässt, doch ist die Verzuckerung darin viel kräftiger.

Wenn wir anstatt gequetschten Malzes nicht gekeimtes Getreide verwenden, so werden wir bei ähnlicher Versuchsanstellung ebenfalls nur Dextrose antreffen; doch ist die Auflösung der Stärke beim ungekeimten Getreide viel langsamer wie beim gekeimten; um dieselbe ebenso leicht zu machen, genügt es, ein wenig gequetschtes Malz zuzusetzen.

Durch die vorhergehenden Versuche kann man auf die Präexistenz eines glukoseerzeugenden Fermentes schliessen, die Glukase, in den Körnern vor der Keimung und auf die Entstehung einer verflüssigend wirkenden Diastase, die Maltase [3]), durch die Keimung.

---

[1]) La Glucase et la saccharification glucosique des matières amylacées. (La sucrerie indigène et colon. T. XXVII. 1886. p. 226.)

[2]) Hiermit sind unsere Erfahrungen nicht im Einklange.

[3]) Cuisinier gebraucht hier das Wort »Maltase« in einem anderen Sinne wie im gegenwärtigen Aufsatze.

Unsere Untersuchungen befestigen diesen Schluss und haben uns überdies auf die Entdeckung der Glukase in den Organen geführt und besonders in den Samen einer grossen Anzahl von Pflanzenarten, gleichgiltig, ob diese Samen Stärke enthalten oder nicht.

Die Glukase, wenig entwickelt in den trockenen Körnern, entwickelt sich durch das Einweichen; man findet dann, dass die Glukase zwar in dem Einweichwasser vorkommt, jedoch hauptsächlich in den geweichten Samen selbst zurückbleibt.

Es blieb nun noch übrig, festzustellen, welche Rolle die Form der Stärke auf die Glukosebildung ausübt. Zu diesem Zwecke haben wir mit Stärkekleister unter den folgenden Umständen gearbeitet:

Wir haben beobachtet, dass, wenn wir bei einer Temperatur unterhalb 60° C ein Gemisch von Kleister und eingeweichtem Maismehle sich selbst überlassen, nur eine unbedeutende Verflüssigung des Kleisters stattfindet.

Wird demselben Gemische unter gleichen Bedingungen viel Malz zugegeben, so verflüssigt der Kleister bald, doch entsteht hauptsächlich nur Dextrin und Maltose.

Wenn aber nur sehr wenig Malz zugesetzt wird, so findet die Verflüssigung langsam statt und ergiebt eine reichhaltige Dextroselösung.

Aus diesen Versuchen sieht man, dass es für die Glukosebildung geeignet ist, nur wenig Malz zu gebrauchen, man aber diese Art der Verzuckerung sowohl mit roher Stärke wie mit verkleisterter erreichen kann.

Eine charakteristische Eigenschaft der durch Glukoseverzuckerung erhaltenen Würzen ist die Leichtigkeit, womit der Zucker auskrystallisiert, wenn zu dem bis auf 40° Baumé eingedickten Safte ein Stück gewöhnlicher Glukose zugesetzt wird. Die so erhaltene Masse besteht beinahe ausschliesslich aus gärungsfähigem Zucker mit 1 oder 2 Proz. Dextrin; wir werden Gelegenheit haben, bald auf die Zusammensetzung dieses neuen Zuckers zurückzukommen.

Die Entdeckung der Glukase wirft einiges Licht auf manche Fragen, welche zusammenhängen mit der Vergärung roher Stärke bei Gegenwart von Malz und Bierhefe.

Paris, 25. Februar 1886.«

Ich habe Cuisinier's Angaben wörtlich übersetzt, nicht nur wegen ihres reellen Interesses, sondern auch um die vorhin in diesen Seiten vorgeführten, von denjenigen von Cuisinier abweichenden Erfahrungen deutlich zu betonen. Besonders Cuisinier's Behauptung von der allgemeinen Verbreitung der Glukase hat sich, wenigstens für die höheren Pflanzen, wie unten gezeigt werden soll, nicht recht bestätigt. Doch kommt das Enzym sehr allgemein bei Schimmelpilzen vor.

2. Darstellung der Rohglukase nach Géduld.

Im Jahre 1891 erschien im Journal de la Distillerie Française eine Arbeit von Géduld, welche im Laboratorium von Jules Cuisinier ausgeführt war und worin sowohl ein Verfahren zur Bereitung des Enzyms wie eine nähere Beschreibung von der Einwirkung desselben auf Stärke, Dextrin und Maltose gegeben wird. Ich muss den Inhalt dieser Arbeit als bekannt voraussetzen, wozu das ausführ-

liche Résumé von Windisch[1]) noch besondere Veranlassung giebt. Für meinen Zweck genügt es, darauf hinzuweisen, dass Géduld sichergestellt hat, dass die durch die Glukase erzeugte Zuckerart wirklich Glukose ist, was durch Cuisinier noch einigermassen zweifelhaft gelassen war, und ferner, dass die optimalen Bedingungen für die Glukasewirkung nahezu dieselben sind, wie für die Malzdiastase[2]).

Bei der Darstellung meiner eigenen Glukasepräparate habe ich Géduld's Vorschrift so genau wie möglich befolgt, gelangte jedoch in einigen Nebensachen auf etwas anderem Wege zu einem besseren Resultate. Ich will hier einen meiner Präparationsversuche genau beschreiben.

Durch meine Kahmpilzmethode zum Nachweise der Glukase hatte ich gefunden, dass dieses Enzym in den ungekeimten Maiskörnern hauptsächlich im hornartigen Teile des Endosperms vorkommt, während der mehlige Teil desselben sowie der Embryo viel weniger Glukase enthalten. Ferner fand ich, dass Géduld's Vorschrift, die Körner vor der Zerkleinerung ein bis zwei Tage einzuweichen, entschieden verwerwerflich ist, weil dabei ein wenig Maismalzgranulase entsteht, welche nicht gut von der Glukase getrennt werden kann. Ich verfuhr daher wie folgt:

Sechs Kilo trockenen, grosskörnigen, gelben, amerikanischen Maises wurden zwischen Walzen grob gemahlen. Das Sortieren durch Sieben wurde mit viel Aufmerksamkeit überwacht, so dass sowohl die Schalen wie die Keime und das staubfein gemahlene mehlige Endosperm sehr vollständig entfernt wurden. Dadurch gelang es schliesslich, 3½ kg einer sehr gleichmässigen, aus glasigen, scharfeckigen, hornartigen Endospermteilchen zusammengesetzten Masse zu bekommen[3]). Diese wurde dann extrahiert mit 5 l destillierten Wassers, wozu 500 cm³ Alkohol von 96 Proz. und 2 g Weinsäure gesetzt waren, und zwar bei 15° à 20° C. Nach 30 Stunden war keine Spur von Bakterienwachstum bemerkbar und es wurde filtriert nach Delbrück's Methode[4]), wobei 4½ l eines wasserklaren Filtrates erhalten wurde, welches F_1 genannt werden soll. Dieses wurde durch Vermischen mit dem gleichen Volum Alkohol von 96° unvollkommen präzipitiert, wobei ein Niederschlag D_1 und Filtrat F_2 erhalten werden, es ist also

$$F_1 = F_2 + D_1.$$

Das Filtrat F_2 wurde dann durch Alkohol in Uebermass vollständig präzipitiert, wobei ein Filtrat F_3, welches weggeworfen wurde, und ein Präzipitat D_2 entstanden, also

$$F_2 = F_3 + D_2$$

$$\text{und } F_1 = D_1 + D_2.$$

Es waren auf diese Weise aus dem ursprünglichen Filtrate F_1 also zwei Rohglukasepräparate D_1 und D_2 erhalten. D_2 wurde abgepresst, getrocknet und pulverisiert und für Enzymversuche verwendet.

D_1 wurde dagegen noch einmal fraktionniert. Dazu wurde das noch teigige Prä-

[1]) Ueber ein neues Enzym: die Glukase. (Wochenschr. f. Brauerei. Jahrg. VIII 1886. No. 19. p. 545. No. 20. p. 568. No. 22. p. 618.)

[2]) Géduld's Beobachtungen über Maisglukase wurden aufs neue bestätigt durch Morris in »Transactions of the Institute for Brewing«. March 1893. Zu vergl. Windisch, »Ueber die Glukase«. (Wochenschr. f. Brauerei. Jahrg. X. p. 365.) Das Original war mir nicht zugänglich.

[3]) Es wäre richtig gewesen, diese Masse fein zu mahlen, weil die Glukase sehr schwer löslich ist und schwierig diffundiert. Doch habe ich das damals versaumt.

[4]) Maerker, Spiritusfabrikation. 5. Aufl. 1890. p. 131.

zipitat mit destilliertem Wasser, welches 0,4 g Weinsäure pro Liter und etwas Alkohol enthielt, in Ueberschuss versetzt. Die Masse löst sich auch bei langem Stehen und Schütteln nur sehr unvollständig und giebt beim Filtrieren einen unlöslich zurückbleibenden Teil D_3 und ein Filtrat F_4. Dieses letztere wird dann mit Alkohol im Ueberschuss vollständig präzipitiert, wobei D_4 erhalten wird. D_3 und D_4 werden dann ebenfalls bei 65° C getrocknet und pulverisiert. Auf diese Weise wurden die sämtlichen aus dem Maisendosperm mit dem verdünnten Alkohol extrahierten Stoffe in der Form von drei Präzipitaten D_2, D_3 und D_4 von verschiedener Löslichkeit erhalten. Hiervon hat sich D_3, welches am wenigsten löslich ist, trotzdem als das glukasereichste ergeben. Auch fand ich, dass, wenn ich das Fraktionieren derweise ausführte, dass ich aus dem ursprünglichen Filtrate durch unzureichende Alkoholzusetzung hinter einander drei Präzipitate absonderte, keines davon so wirksam war wie D_3, und darum habe ich eben die beschriebene Darstellungsweise als Beispiel für das beste Präparierverfahren angeführt.

Es ist klar, dass die nach diesem Verfahren bereiteten Glukasepräparate durchaus nicht als reine betrachtet werden können und dass es selbst schwierig ist, die Natur der Verunreinigungen genauer anzugeben. Man könnte meinen, es würde darin viel Dextrin vorkommen, doch muss ich demgegenüber bemerken, dass die Glukase die Dextrine angreift und in Glukose überführt, so dass die ziemlich lange Dauer der Präparation schon ein Grund ist, weshalb sich der Gehalt an Dextrin vermindern muss. Auch der Peptongehalt kann in meinen Präparaten, z. B. in D_3, nicht besonders gross sein, denn wenn aus dem bei 100° C getrockneten Pulver der Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt und daraus der Eiweissgehalt durch Multiplikation mit 6,25 berechnet wird, so ergiebt sich für

	Stickstoff	Eiweiss
D_2	4,78 Proz.	29,87 Proz.
D_3	1,11 „	6,96 „
D_4	2,20 „	13,75 „

Reduktionsfähige Körper finden sich in den Präparaten nicht. Ich glaube deshalb, dass die Körper, welche die Enzyme darin begleiten, hauptsächlich neben Eiweisskörpern Pflanzenschleim sein müssen. Vergleicht man die zuckerbildende Kraft der drei Präparate so ergiebt sich, dass dieselbe bei D_3 etwas ist wie bei den beiden anderen, wenn auch die Differenz nicht besonders gross ist. Merkwürdigerweise ist aber der Stickstoffgehalt gerade von D_3 am geringsten, so dass es deutlich ist, dass entweder der Gehalt von allen diesen Präparaten an reinem Enzym, vorausgesetzt, dass dieses ein stickstoffhaltiger Körper ist, sehr gering ist, oder dass das Enzym stickstofffrei ist und sich gerade in D_3 besonders angehäuft vorfindet. Ich meinerseits neige zur ersteren Ansicht, d. h. ich glaube, dass die amylolytischen Enzyme stickstoffhaltige Körper sind und in unseren Präparaten nur in verschwindend geringer Menge angehäuft sind.

3. Nachweis von vorübergehender Dextrin- und Maltosebildung aus löslicher Stärke durch Glukase.

Gėduld bestimmte die Wirksamkeit seiner Glukasepräparate aus der Drehungsabnahme für das polarisierte Licht, sowie aus der Veränderung im Kupferreduktions-

vermögen, welche eine Maltoselösung von bekanntem Gehalte erfährt. Zur Bestimmung der Einwirkung auf Dextrin und Stärke befolgt er ein kombiniertes Verfahren, wobei Drehung und Reduktion bestimmt werden vor der Einwirkung der Glukase, nach der Einwirkung des Enzyms, und nachdem der gebildete Zucker durch Hefe vergoren ist. Durch Krystallisierenlassen des aus Maltose erhaltenen Zuckers hat er sich überzeugt, dass es sich dabei nur um Dextrose handeln kann. Ich will hinzufügen, dass auch ich reine Maltoselösungen durch meine Glukasepräparate umgewandelt, und daraus den Zucker nahezu quantitativ als krystallisierte Glukose zurückerhalten habe. Es kann deshalb als allseitig festgestellt betrachtet werden, dass das Produkt der Einwirkung der Glukase auf Maltose sicher allein Glukose ist. Andererseits wurde oben schon vorgreifend bemerkt, dass die Glukase, wenn auch sehr langsam, aus löslicher oder gekochter Stärke vorübergehend Dextrin zu erzeugen vermag, welches jedoch seinerseits bei Fortdauer der Glukaseeinwirkung in Glukose übergeht. Soviel steht fest, dass alle von mir untersuchten Dextrine durch Glukase zersetzt werden, und zwar viel schwieriger wie Maltose, dass sie jedoch viel leichter in Glukose übergehen, wie lösliche oder verkleisterte Stärke. Frische Stärkekörner werden, ausserhalb der Pflanzen, ebensowenig durch Glukase angegriffen wie durch Diastase. Auch Inulin wird durch Glukase durchaus nicht verändert. Für den Nachweis der Glukase in sehr geringen Mengen, z. B. wenn es sich darum handelt, die Gegenwart dieses Körpers in vereinzelt vorliegenden Pflanzensamen anzuzeigen, können weder das polarisierte Licht, noch die Kupferreduktion in Betracht kommen. Dagegen hat sich ergeben, dass in solchen Fällen die auxanographische Methode zum Ziele führen kann.

Dieses trifft ebenfalls zu in Bezug auf den Nachweis von Dextrin bei gleichzeitiger Gegenwart von Maltose und Glukose oder von beiden. Dazu erfordert die in Kapitel I beschriebene Untersuchungsmethode jedoch eine Erweiterung, zu deren Darstellung ich nun übergehe.

Während Maltose durch Glukase quantitativ in Glukose übergeführt wird, entsteht bei der Einwirkung von Glukase auf lösliche Stärke vorübergehend eine Dextrinart, welche jedoch durch das Enzym selbst zu Glukose zerlegt wird und sich deshalb leicht der Beobachtung entzieht.

Durch das Diffusionsverfahren mit gewissen Hefearten als Reaktiv lässt sich die Gegenwart des genannten Körpers anzeigen, und zwar auf folgende Weise:

In einer Glasdose wird eine Gelatineplatte angefertigt, welche aus zwei verschiedenen Hälften besteht. Der eine Teil A (vergl. Figur) hat folgende Zusammensetzung:

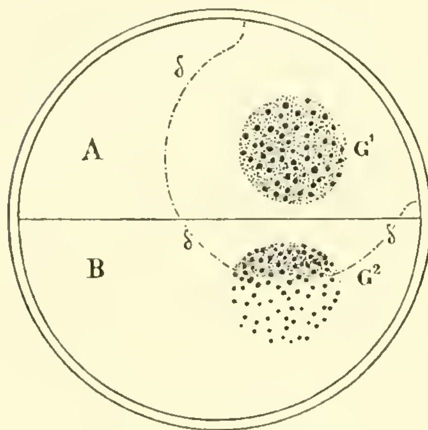
10 Proz. Gelatine,
½ „ lösliche Stärke,
¼ „ Asparagin,
1/20 „ Kaliumphosphat.

Vor dem Erstarren war S. e l l i p s o i d e u s, oder irgend eine andere nicht auf Dextrin reagierende, aber mit Asparagin als Stickstoffquelle gut wachsende Maltosehefe untergemischt.

Der andere Teil B hat dieselbe Zusammensetzung, nur dass daraus die lösliche Stärke fortgelassen ist.

Als Weinhefe habe ich die aus jungem Rotwein isolierte Form verwendet. Bier- und Presshefe sind weniger geeignet, weil deren Wachstum durch den Druck der Gelatine etwas gehemmt wird, was bei Weinhefe nicht der Fall ist.

Das Eingiessen in die Dose geschieht derweise, dass diese für das Aufnehmen von der Gelatine A zunächst schief gestellt und erst, wenn die Gelatine durch die Abkühlung zu dickflüssig geworden ist, um sich weiter auszubreiten, horizontal gestellt wird. Die Gelatine B kann dann ohne weitere Fürsorge auf die noch leere Bodenhälfte gegossen werden, wobei auf ein gutes Zusammenfliessen an der Trennungslinie zwischen A und B geachtet wird. Die lösliche Stärke bleibt auf A beschränkt, weil nicht diffusionsfähig.



Es wird nun in geringer Entfernung von einander sowohl auf A wie auf B ein wenig Gukasepulver aufgestreut [1]).

Da sich in A aus der löslichen Stärke, so weit die Glukase einwirkt, Glukose bildet, so muss auf gewöhnliche Weise dort ein Ellipsoideus auxanogramm [2]) entstehen. Wenn jedoch dabei noch ein anderer Körper entsteht, z. B. eine diffusionsfähige Dextrinart, welche nicht durch S. ellipsoideus absorbiert wird, so kann dieser Körper sich durch Diffusion in den als B bezeichneten Teil der Gelatineplatte hineinbewegen. Da sich darin aber eine Maltosehefe vorfindet, welche auch mit Glukose ausgezeichnet wächst, jedoch nicht mit Dextrin, so muss unter dem auf B liegenden Glukasepulver ein Auxanogramm entstehen, wenn der betreffende Körper bis zu dem Bezirke der Glukase fortdiffundiert und hier in Glukose verwandelt wird. Auf diese Weise hat nun die Erfahrung für die Ansicht entschieden, dass die Glukase vorübergehend Dextrin erzeugt. Bei der beschriebenen Versuchsanstellung war zu erwarten, dass das Auxanogramm »Halbmondform« annehmen sollte, was auch wirklich zutrifft und wohl keiner weiteren Erklärung bedürftig ist.

Dagegen muss ich noch hervorheben, weshalb ich eine Maltosehefe verwende, und nicht gerade wie bei den gewöhnlichen Versuchen zum Nachweis der Glukase S. Mycoderma oder S. fragrans? Dazu giebt der Umstand Veranlassung, dass es sich darum handelt, bei den Versuchen Maltose von Dextrin zu unterscheiden. Wenn sich nun in A und B S. Mycoderma vorfände, so würde sowohl Maltose wie Dextrin bis unter den Glukasefleck in B hineindiffundieren können und darunter ein Mycodermaauxanogramm bilden. Wenn sich in A und B dagegen eine Maltosehefe vorfindet, so wird diese auch ausserhalb des Glukaseflecken in Wachstum kommen, wenn Maltose zufliesst, dagegen nur unterhalb des Glukasefleckes, wenn eine Dextrinart zufliesst, welche, um assimilationsfähig zu sein, zuvor in Zucker (sei es Maltose oder Glukose) umgewandelt werden muss. Da sich nun ergiebt, dass auf

---

[1]) In der Figur durch grobe Punktierung angegeben.

[2]) In der Figur durch feine Punktierung angegeben.

dem Wege zwischen den beiden Glukaseflecken kein Wachstum der Maltosehefe bemerkbar wird, so schliesse ich, dass jedenfalls Dextrin und nicht Maltose als Nebenprodukt vorübergehend bei der Glukosebildung aus Stärke entsteht. Kaum brauche ich hervorzuheben, dass, wenn der Glukasefleck G^2 durch Malzdiastase ersetzt wird, die Weinhefe darunter ebensogut ein Auxanogramm bildet, nur wird dann das Dextrin in Maltose übergeführt und nicht in Glukose.

Die Frage, weshalb das Dextrin das Glukasefeld G^1 überhaupt verlässt, während dasselbe doch ebensogut von G^1 wie von G^2 in Glukose verwandelt werden kann, muss dahin beantwortet werden, dass allerdings ein Teil des Dextrins wohl unzweifelhaft durch G^1 in Glukose wird übergehen müssen, dass aber ein Teil desselben sich infolge der Gesetze der Diffusion, nach welchen ein Stoff jedem Punkte von geringerer Konzentration zuströmt, sich der Einwirkung von G^1 entziehen muss, um teilweise durch G^2 zersetzt zu werden.

In unserer Figur ist durch einen Zirkel (ddd) die mutmassliche Grenze des Diffusionsfeldes angegeben, welches das Dextrin bei dem Zustandekommen des unter G^2 ausgebildeten halbmondförmigen Auxanogrammes erzeugt haben muss.

Die Leichtigkeit, womit das durch Glukase erzeugte Dextrin, nicht nur durch dieses Enzym in Glukose, sondern durch andere Amylasearten, wie Maltase und Ptyalin in Maltose übergeführt wird, haben mich veranlasst, dasselbe oben bei der allgemeinen Besprechung der amylolytischen Enzyme als Maltodextrin für die Charakteristik der verschiedenen Amylasegattungen zu verwenden. Dass der Name des Körpers neuerdings in Isomaltose umgetauft ist, ist bekannt.

Durch das Anbringen einer kleinen Abänderung in der beschriebenen Versuchsanstellung konnte ich zeigen, dass Glukase auch vorübergehend aus Stärke Maltose erzeugt. Dazu wurde wie folgt verfahren:

Anstatt die Hälfte A der Gelatineplatte mit Weinhefe zu beschicken, war dahin Saccharomyces Mycoderma gebracht. B blieb aber wie oben mit S. ellipsoideus gemischt.

Es wurde nun auf A lokal Glukase gestreut, was jedoch auf B nicht notwendig ist.

Da der Kahmpilz als Glukosehefe etwa aus dem Glukasefelde auf A entweichende Maltose frei fortdiffundieren lässt, erreicht diese bald die Grenze zwischen A und B, geht in B über und findet hier die Ellipsoideushefe, welche als Maltosehefe nun wachsen kann und durch Erzeugung eines zirkelsegmentähnlichen Auxanogrammes, mit der Grenzlinie zwischen A und B als Sehne, die Gegenwart der Maltose anzeigt. Der ganze Sachverhalt scheint mir so klar, dass die Anfertigung einer besonderen Figur überflüssig erschien.

Indem es mir nun obliegt, über die Verbreitung und den Nachweis der Glukase im einzelnen zu handeln, scheint es mir nicht überflüssig, zu bemerken, dass ich hier nur die Beobachtungen mit positivem Ergebnisse berücksichtige. Mit Pulvern und Extrakten von Blätern und Stengelteilen von allerlei Bäumen und Kräutern habe ich Versuche angestellt, welche durchgehends ein negatives Resultat ergeben haben, so dass ich glaube, zu dem Schlusse berechtigt zu sein, dass die Glukase nur wenig verbreitet ist.

4. Verbreitung der Glukase.

a) Allgemeines.

Die Glukase scheint sowohl im Pflanzen- wie im Tierreiche keine sehr ausgedehnte Verbeitung zu besitzen. Inzwischen muss dieses mit einiger Einschränkung behauptet werden, denn die sehr geringe Löslichkeit dieses Körpers kann leicht Veranlassung geben, dessen Gegenwart zu übersehen. Dieses ist besonders deshalb so, weil die Erfahrung lehrt, dass die Eigenschaften der Glukase, wenn man dieselbe nach der für Maismehl angegebenen Vorschrift bereitet, nicht immer in aller Kraft behalten bleiben. So enthält gewöhnliches Reismehl (Oryza sativa) beträchtlich viel Glukase. Als ich aber versuchte, daraus ein reichhaltigeres Präparat anzufertigen, so wurde ich getäuscht, und schliesslich bekam ich einen Stoff, welcher zu meiner Ueberraschung ziemlich stark diastatisch auf Stärke wirkte, d. h. daraus Maltose bildete, was ich am Reismehl an sich nicht bemerkt hatte, doch war das Vermögen, Maltose in Glukose umzuwandeln, beinahe gänzlich verloren. Etwas Aehnliches fand ich bei Versuchen aus Hafermehl, welches ebenfalls ziemlich glukasereich ist, dieses Enzym zu bereiten. Die nahe liegende Vermutung, dass die Erscheinung durch eine Umwandlung von Glukase in Granulase erklärt werden kann, entbehrt vorläufig aber noch des Beweises.

Andererseits dürfte das Diffusionsverfahren bei der Verwendung der so leicht beweglichen Maltose, selbst dann, wenn sehr schwer lösliche Glukasepräparate zur Untersuchung kommen, doch nach allem Anscheine zur Auffindung des Enzyms Veranlassung geben. Wenn es mir nun nicht gelingen wollte, weder mit dem Extrakte, noch mit getrockneten und nachher pulverisierten, noch mit den gequetschten und zerriebenen Blättern von Lolium perenne und anderen Gräsern die Glukosereaktion im Mycoderma-Maltoseboden zu erzielen, so muss ich wohl annehmen, dass die Glukase in den gewöhnlichen Grasblättern fehlt. Es ist aber sehr leicht, dieselbe in den Blättern der Maispflanze bei gleicher Behandlung nachzuweisen, und aus dem wässerigen Extrakt dieser Blätter habe ich durch Präzipitieren mit Alkohol ziemlich kräftige Glukasepräparate dargestellt; dasselbe gilt für die Maiswurzeln, welche sich als reich an Glukase (und unter Umständen auch an Invertase) ergeben. Ferner habe ich von Blättern untersucht Acer Pseudoplatanus, Deutzia scabra, Quercus pedunculata, Cytisus Laburnum und von zahlreichen anderen Kräutern und Bäumen, alle mit negativem Erfolge. In Keimstengeln von keimenden Erbsen sowie in den Samenlappen derselben konnte ich keine Glukase auffinden, während sich darin sehr leicht Granulase nachweisen lässt, ebenso bei Vicia Faba. Auch in keimenden Datteln habe ich vergebens nach Glukase gesucht; merkwürdigerweise findet sich darin aber auch durchaus keine Diastase und der Prozess der Celluloselösung im holzigen Endosperm dieser Samen geschieht durch einen noch nicht aufgeklärtem Vorgang [1]).

---

[1]) Dass es sich dabei dennoch um eine Enzymwirkung handelt, folgere ich daraus, dass die Cellulose, ehe sie sich löst, noch vorher in einen sich mit Jod bläuenden Körper umgewandelt wird.

b) Distribution der Glukase im Maiskorn. Vorkommen in anderen Getreidekörnern.

Nicht alle Teile des Maiskornes sind gleich reich an Glukase. Eine genaue Untersuchung der verschiedenen Teile ergiebt, dass der ruhende Keim zwar nicht vollständig frei ist von Glukase, jedoch davon nur Spuren enthält. Während der Keimung vermehrt sich der Glukasegehalt nicht oder nur unbeträchtlich, der Keimling erzeugt diesen Körper in kaum nachweisbarer Quantität, während die Granulasebildung eben im Verlaufe der Keimung erst recht stark wird.

Im Endosperm ist die Glukase nicht gleichmässig verteilt, sondern, wie wir früher gesehen, angehäuft in den äusseren Schichten, welche eine hornartige Konsistenz besitzen, und fehlt beinahe gänzlich im mehlartigen Innern desselben.

Granulase und Maltase fehlen im Maisendosperm vor der Keimung vollständig, Maltase entsteht darin niemals, Granulase dagegen beim Keimprozesse als Produkt des Keimlings und wird durch das an das Endosperm grenzende Cylinderepithel des Scutellums erzeugt, die Zellen des Innern des Keimlings sind diastasefrei. Ehe die Keimung beginnt, lässt sich in diesem Cylinderepithel schon mit Leichtigkeit Granulase nachweisen, während, wie gesagt, der Glukasegehalt desselben minimal ist.

Von anderen Getreidekörnern untersuchte ich Sorgho (Andropogon Sorghum), Hirse (Panicum miliaceum), Weizen, Roggen und Gerste genauer. In Bezug auf die Sorghokörner lässt sich genau dasselbe sagen wie von Mais: Das Endosperm ist sehr reich an Glukase und diastasefrei, während der Keimung erzeugt das Cylinderepithel des Keimlings reichlich Granulase und keine Glukase. Auch hier wird die Keimung eingeleitet durch Glukose, welche aus Stärke entsteht: im ferneren Verlaufe des Wachstums wird dagegen zuerst Maltose gebildet. Ebenso bei Hirse.

Glukase wurde ebenfalls gefunden im mehligen Endosperm von Sparganium, Carex und Luzula.

Weizen, Roggen und Gerste [1]) verhalten sich auf eine ganz andere, jedoch unter sich identische Weise: Das Endosperm dieser Körner enthält vor der Keimung nur Maltase und ist glukasefrei. Während der Keimung beginnt eine sehr kräftige Bildung von Granulase (und wahrscheinlich auch Maltase) im Cylinderepithel des Scutellums und diese Körper strömen in das Endosperm hinein. Im Verlaufe der Keimung entsteht bei diesen Körnern ebenfalls ein wenig Glukase, und zwar sowohl im Cylinderepithel des Scutellums wie in der Aleuronschicht, welche das Endosperm aussen bekleidet, jedoch nur in sehr geringer Quantität. Zu gleicher Zeit mit dieser Glukasebildung aus der Aleuronschicht wird darin, und zwar in viel beträchtlicherer Quantität Granulase produziert. Maltasebildung durch das Aleurongewebe konnte dagegen nicht nachgewiesen werden. Bei der weiteren Entwicklung der Keimpflanze während des Malzprozesses entsteht in den Geweben der Wurzeln und Blätter Rohrzucker, welcher durch zu gleicher Zeit erzeugte Invertase später beim Einmaischen im Glukose und Laevulose übergehen kann, so dass es verfehlt wäre, den nicht unbeträchtlichen Glukosegehalt der Würzen der Brauereien und Presshefefabriken (in den Würzen der Presshefefabrik Delft 1—2 Proz., d. h. bis zu 20 Proz. des Gesamtzuckers) auf die Glukase allein zurückzuführen. Da die Getreideglukase kaum oder nicht dif-

[1]) Aegilops ovata und Lolium perenne gehören ebenfalls hierher.

fundiert, so braucht man, um die Lokalisation derselben anzuzeigen, nur einen dünnen Querschnitt des Endosperms auf einen empfindlichen Kahmpilzmaltoseboden zu legen; schon nach 24 Stunden bekommt man ein Auxanogramm von der Form des Querschnittes, worin die eigentümlich gefaltete Aleuronschicht sich aufs schönste durch kräftiges Kahmpilzwachstum hervorhebt infolge ihres Reichtums an Glukase.

e) Verbreitung der Glukase bei anderen Monokotylen und bei Dikotylen und im Körper höherer Tiere. Bei Schimmelpilzen. Zymoglukase aus Hefe.

Durch viele Versuche mit allerlei Samen von Dikotylen und Monokotylen hat sich ergeben, dass die meisten endospermfreien Samen sowie die Samen mit »fleischigem« und »hornartigem« Endosperm diastase- und glukasefrei sind [1]). Dagegen enthalten alle Samen mit mehligem Endosperm Glukase oder Maltase im Endosperm und erzeugen Granulase bei der Keimung im Keimlinge. Ich glaube zur Aufstellung folgender allgemeiner Regeln berechtigt zu sein:

1. Granulase, Maltase und Glukase werden in erheblichen Mengen nur in den Samen mit mehligem Endosperm gefunden, in den Samen mit hornartigem und mit fleischigem Endosperm, sowie in den endospermfreien Samen, fehlen diese Enzyme entweder ganz oder es entsteht, wie bei den Papilionaceen, ein wenig Granulase im Innern der Samenlappen während der Keimung. Die Monokotylen, bei welchen Glukase oder, viel seltener, Maltase thatsächlich schon gefunden oder zu erwarten sind, gehören deshalb zu einer der folgenden Familien mit mehligem Endosperm: Cyperaceen, Gramineen, Sparganiaceen, Eriocaulaceen, Flagellariaceen, Restionaceen, Centrolepidaceen, Juncaceen, Musaceen, Marantaceen, Zingiberaceen.

2. Granulase wird erst beim Keimungsprozesse gebildet, gewöhnlich durch das Epithel des Keimlings, selten auch durch andere Teile, wie durch das Aleurongewebe der Getreidekörner.

3. Eine dritte Regel, welche das Studium der Monokotylensamen mit mehligem Endosperm ans Licht brachte, ist diese:

Maltase und Glukase sind die einzigen Enzyme, welche im mehligen Endosperm vorkommen, und zwar stellvertretend, so dass das mehlige Endosperm des Getreides entweder Glukase und keine Maltase enthält, wie bei Mais, Sorgho und Hirse, oder Maltase und keine Glukase (oder wenigstens nur Spuren), wie bei Weizen, Roggen, Gerste und vielen anderen Gräsern.

Von den Dikotyledonen kommen die folgenden Familien mit mehligem Endosperm als sicher oder wahrscheinlich glukasehaltig hier in Betracht: Plumbaginaceen, Mesembryanthemaceen, Nymphaeaceen, Frankeniaceen, Caryophyllaceen (p. p.), Paronychiaceen, Portulaccaceen, Tetragoniaceen, Chenopodiaceen, Amarantaceen, Nyctaginaceen, Phytolaccaceen und Polygonaceen.

Von allen diesen habe ich die Samen von Mirabilis Jalapa (Nyctaginaceen), Polygonum Fagopyrum (Polygonaceen,), Beta vulgaris und

---

[1]) Die sehr schwachen diastatischen Wirkungen, welche beinahe alle Pflanzensäfte zeigen, kommen hier nicht in Betracht.

S p i n a c i a o l e r a c e a (Chenopodiaceen), welche aufs Geratewohl aus Samen mit mehligem Endosperm gewählt wurden, durch das Diffusionsverfahren und auxanographisch näher untersucht. Es hat sich ergeben, dass das mehlige Keimweiss ausnahmslos nur Glukase führt, und zwar eine leicht diffundierbare Modifikation. Dagegen erzeugen die Keimlinge massenhaft Granulase, welche beim Keimungsprozesse das mehlige Endosperm allseitig durchdringt. Besonders die so hoch interessanten keimenden Samen von M i r a b i l i s sind für diese Untersuchung geeignet. An dieser Stelle will ich nur hervorheben, dass die Glukase sicher nicht in den Samenlappen gebildet wird, sondern sozusagen als Reservematerial zwischen dem feinkörnigen Amylum im Endosperm abgelagert vorkommt. Die Samenlappen umschliessen bei M i r a b i l i s das Endosperm, welches daraus leicht in einem einzigen Klumpen entfernt werden kann. Bei der Keimung scheiden beide Samenlappen Granulase ab, und zwar sehr viel und durchaus keine Glukase. Diejenige Seite (rückwärts) des einen Samenlappens, welche das Endosperm berührt, ist in dieser Beziehung am meisten aktiv. Schwächer diffundiert die Granulase aus der Bauchseite jenes Samenlappens. Noch schwächer ist die Granulasebildung im anderen Samenlappen, welcher das Endosperm nicht berührt, sondern sich der Bauchseite des ersten Cotyledo anschmiegt. Maltase fehlt bei den von mir untersuchten Dikotylensamen vollständig.

Von tierischen Geweben untersuchte ich Blut, Pankreas und Leber von Schweinen und Rindern und fand überall etwas Glukase, jedoch nur im Lebergewebe in etwas ansehnlicher Quantität, wenn auch sehr viel weniger, wie in den genannten Pflanzensamen. Auch menschlicher Speichel enthält Spuren von Glukase.

Schliesslich erlaube ich mir noch, zu bemerken, dass ich in den Hefezellen einen Körper gefunden habe, welchen ich Zymoglukase nennen will und welcher unter gewissen Bedingungen Maltose in eine Substanz umwandelt, welcher durch M y c o d e r m a leicht assimiliert wird. Meine Zymoglukase stirbt schon vollständig bei 55° C, während Glukase (und auch Invertase) dieser Temperatur nicht erliegen, sondern bis 68° à 70° C erhitzt werden müssen, ehe der Tod erfolgt. Inzwischen hat auch E. F i s c h e r Mitteilungen über die Existenz eines Maltose zerlegenden Enzyms in Hefezellen gemacht, und werden voraussichtlich noch weiter Mitteilungen von verschiedenen Seiten nachfolgen. Eben wie bei der Laktase (das Enzym des Milchzuckers) sind die Bildungs- und Abscheidungsverhältnisse der Zymoglukase noch verwickelter wie bei der Diastase und Glukase.

Auf die sehr allgemeine Verbreitung der Glukase (oder wahrscheinlicher der Zymoglukase) bei den verschiedenartigsten Schimmelpilzen, worunter einzelne unserer gemeinsten P e n i c i l l i u m -, M u c o r - und A s p e r g i l l u s arten, hoffe ich bei einer anderen Gelegenheit zurückzukommen.

De biologische wetenschap en de bacteriologie.

Redevoering gehouden bij de opening der Lessen in de Bacteriologie aan de Polytechnische School, Donderdag 26 September 1805, Delft.

Mijne Heeren Studenten en Gij Alle die dit uur met Uw tegenwoordigheid vereert,

Geachte Toehoorders!

Bij de beslissing over de keus van een onderwerp van algemeenen aard, geschikt om bij den aanvang mijner lessen in Bacteriologie te worden behandeld, vond ik mij geplaatst voor een drietal gezichtspunten, wier beteekenis mij voor de Polytechnische School zoozeer gelijkwaardig toescheen, dat ik mijn standpunt onjuist zou omschrijven door aan een daarvan voorrang boven de beide andere toe te kennen.

Het geldt hier namelijk de toevoeging der Biologie, dat is van de Wetenschap van het Leven, als tak van onderwijs aan het stelsel der elementaire wetenschappen, waarop de toegepaste gegrondvest zullen worden, aan de Wiskunde, de Mechanica, de Natuurkunde en de Scheikunde. In zoover heb ik met recht, bij deze onze eerste samenkomst »Het Karakter der Biologische Wetenschap« in bespreking te brengen. De stichting van het Bacteriologisch Laboratorium, duidt op de richting, welke hier bij het Biologisch onderwijs op den voorgrond zal worden geplaatst, zoodat Gij kunt verwachten van mij iets te zullen vernemen aangaande mijn opvattingen over »Bacteriologisch Onderwijs in dienst van de Biologische Wetenschap.« Maar bij het onderwijs aan de Polytechnische School moet met de belangen der praktijk worden rekening gehouden: »De Toepassingen van de Bacteriologie in het Praktische Leven«, ziet daar derhalve de derde zijde van mijn taak gelijkwaardig aan de beide andere.

De thans beschikbare tijd zal mij slechts veroorlooven enkele losse grepen uit elk dezer drie onderwerpen te doen, waartoe ik mij de vrijheid voorbehoud door tot titel dezer voordracht te kiezen: *»De Biologische Wetenschap en de Bacteriologie«*, en daarvoor verzoek ik thans Uw aandacht.

Afgezien van de allebeheerschende geestesgaven, welke wij met onze geboorte medebrengen, laat zich de stelling verdedigen, dat een praktisch man alleen in en door de praktijk kan gevormd worden. Onderwijs gedurende de leerjaren, die aan de praktische vorming voorafgaan, kan niet meer beoogen dan het bepalen eener ontwikkelingsrichting, het geven van een vertrouwbaren grondslag om de vruchten van eigen nadenken en waarneming verder op te bouwen en tot een welingericht geheel te vereenigen, waarin nieuw verworven kennis goed geplaatst kan worden en gemakkelijk bereikbaar blijft, wanneer praktische eischen daaraan behoefte zullen doen ontstaan.

Niets is verschillender dan de wijze waarop men iets weet. Door twee personen zal een en hetzelfde verschijnsel in dezelfde woorden kunnen beschreven worden, en niettemin zal bij den eene de daartoe vereischte kennis vruchtdragend kunnen wezen indien hem tevens het verband met andere verschijnselen helder voor den geest staat, terwijl een ander, met even goeden aanleg, maar minder ingewijd in den samenhang van het onderwerp met aangrenzende wetenschappelijke gegevens, dat is in de bijzonderheden, toch in zijn kennis een kapitaal zal kunnen bezitten, dat lager rente afwerpt. De meer en meer veldwinnende overtuiging, dat men in de bijzonderheden, in de schijnbare kleinigheden moet treden, is een gevoelen, dat eerst in onzen tijd in de samenleving is doorgedrongen, doorgedrongen met voldoende kracht om practische gevolgen mede te brengen, en deze zijn ten slotte zichtbaar geworden in den ontzaglijken vooruitgang, in ons, overal rondom ons. De menschelijke geest had vooral vroeger, maar heeft ook thans nog zooveel neiging om zich in bespiegelingen te verliezen en te gelooven aan algemeene beginselen, waaruit zich alles laat afleiden! Het is nog niet heel lang geleden, dat Schopenhauer, den wijsgeer, die wereldsystemen uitdenkt met den Mont Blanc, den natuuronderzoeker, die feiten verzamelt met een molshoop vergeleek. Maar de Mont Blanc is de Mont Blanc gebleven, terwijl de molshopen de vruchtbaarheid van het aardrijk hebben verhoogd.

De haarden, waar de overtuiging van de noodzakelijkheid om aan de nietigste verschijnselen geestkracht en nadenken te wijden ontwikkeld en aangewakkerd wordt, zijn vele en velerlei. Een daarvan en voorzeker een van de machtigste, moet gezocht worden in de Laboratoriën.

Dààr is de plaats, waar de wetenschappelijke en praktische ontdekkingen van alle tijden als het ware op nieuw gedaan worden, op nieuw gedaan door de leerlingen, door de dragers van de toekomst. De proeven, welke aan de ontdekkingen eenmaal ten grondslag hebben gelegen, passeeren in alle bijzonderheden de revue, en al die kleinigheden, welke zich in een voordracht niet wel laten inlasschen, maar wier essentieele beteekenis toch niet is te miskennen, moeten in acht genomen worden en de leerling moet zich daarvan zoo duidelijk rekenschap geven, dat hij de waargenomen verschijnselen in zijn later leven nog met voldoende scherpte zal zien om daarvan onder geheel andere omstandigheden gebruik te maken.

Nieuw is deze beschouwing voorzeker in geenen deele, maar er zijn oude waarheden, welke steeds verdienen herhaald te worden, en het behoort onder anderen tot den taak van het onderwijs dit tegenover het jongere geslacht te doen. Bovendien is er in het bijzondere geval, waarin ik voor U sta, ook bijzondere reden om de genoemde waarheid ter harte te nemen, daar het hier de Biologische wetenschap geldt ten aanzien waarvan de denkbeelden in de maatschappij zoo geheel verschillend zijn van die met betrekking tot hare oudere zusters, de Schei- en de Natuurkunde.

Tot voor korten tijd heeft de Biologie als wetenschap in de algemeene schatting achter gestaan vergeleken met de beide laatst genoemde. Niet omdat er eenig verschil van gevoelen bestaat omtrent de ontzaglijke theoretische waarde van de gegevens, waarmede zij rekening heeft te houden, maar wel aangaande de praktische resultaten, welke door het wetenschappelijk biologisch onderzoek tot nu toe zijn verkregen en de wereld, die slechts zelden geheel onrechtvaardig veroordeelt, heeft ook hier in menig opzicht recht. Maar de wetenschap, welke ongetwijfeld voor de maatschappij daar is, wordt even ongetwijfeld door die zelfde maatschappij voortgebracht en gevormd.

en als de toestand der Biologie tot nu toe, vergeleken met de andere natuurwetenschappen achterlijk moet genoemd worden, dan heeft de maatschappij die achterlijkheid op haar eigen verantwoording te nemen en de middelen te beramen om daarin verbetering te brengen. De stichting van het Bacteriologisch Laboratorium is een der vele bewijzen, dat de tijd der daden ook in dit opzicht is gekomen.

Zonderling zijn de denkbeelden, die ten aanzien van allerlei biologische vraagstukken bestaan, en die eigenlijk geen denkbeelden maar phantasieën moeten genoemd worden. Zelfs op dit oogenblik kan iemand, door een zoogenoemd onderzoek, tot de slotsom komen, dat de persgist in het brooddeeg niet werkt door de aanwezigheid der gistcellen, maar wel door de bacteriën welke er in voorkomen. Beschrijft hij dit in een verhandeling dan is het volstrekt niet onmogelijk, dat de redactiën van de meest ernstige tijdschriften het stuk accepteeren. Toch staat die bewering ongeveer gelijk met de verklaring, dat de rietsuiker alleen gemaakt wordt ter verkrijging van de verontreinigingen, welke daarin in enkele tiende procenten aanwezig zijn, m. a. w. met een meening, waarvan het belachelijke met een zeer geringe hoeveelheid juiste, elementaire chemische kennis kan worden ingezien. Maar die kleine hoeveelheid juiste, elementaire kennis is op Biologisch gebied zoo moeielijk te verkrijgen!

Het is overigens dan ook gemakkelijk om verschillende, in de natuur der Biologie gelegen factoren aan te wijzen, welke hare verdieping als natuurwetenschap aanhoudend tegenwerken. Laat ons een tweetal van de belangrijkste er van iets nader in oogenschouw nemen.

De eerste is de ontzettende Omvang van het Materiaal. Men denke zich eens den toestand, waarin de scheikunde thans nog zou verkeeren wanneer het getal chemische elementen niet 80 of 100 maar 400,000 bedroeg, dat is zoo ongeveer het getal bekende soorten van planten en dieren, waarmede de tegenwoordigen Biologie rekening heeft te houden! Zou dan niet, even als dit op biologisch gebied steeds zoo noodzakelijk is, extensieve classificeerende maar overigens improductieve arbeid ook voor den chemicus onvermijdelijk zijn? terwijl thans bijna elk scheikundig onderzoek, dat nieuwe feiten aan het licht brengt, tevens tot een meerdere of mindere verdieping dezer wetenschap voert. Men vergelijke het periodische systeem der chemische elementen van M e n d e l e j e f f met het natuurlijke systeem van planten en dieren! Het is de wiskunstige kromme vergeleken met den chaos! Maar verstaat mij wel, ik wensch naturlijk niet te beweren, dat men, om een goed bioloog te zijn, met ontzettende getallen van plant- en diersoorten bekend moet zijn, — dit zou gelijk staan met de stelling, dat men geen goed scheikundige zou kunnen wezen zonder de eigenschappen van allerlei zeldzame elementen te kennen. Waarop ik nadruk wil leggen is het feit, dat bij elk biologisch onderzoek met den systematischen factor ernstig moet rekening gehouden worden en dat hier, vele goede krachten over de breedte verdeeld, verhinderd worden om door samenwerking door te dringen in de diepte. IJzer in chemischen zin is ijzer, overal in de heele wereld en alleen bijmengselen bepalen daarvan de practische waarde voor de industrie. Maar biergist en biergist kan in wetenschappelijk biologischen zin, geheel afgezien van bijmengselen, zóó verschillend zijn, dat practische eischen aan de eene gesteld volstrekt niet in de andere worden teruggevonden. Bij een bezoek aan het Bacteriologisch Laboratorium van de Brouwerijschool te München zag ik een verzameling van keurige dicht gelakte F r e u - d e n r e i c h'sche fleschjes, waarin de giststammen bewaard worden, welke uit de

biergisten van verschillende Zuid-Duitsche bierbrouwerijen zijn geïsoleerd en waarvan van tijd tot tijd, aan de betrokken brouwers culturen teruggezonden worden, om hunne gistingen in den gewenschten toestand te behouden. Mijn oog viel daarbij op No. 314, ik vernam dat dit volstrekt geen fantazienommer was en dat er meer dan 314 biergiststammen, alleen in dat laboratorium in cultuurreeksen worden aangehouden. In het werk van Lindner over de mikroskopische bedrijfscontrôle in de gistingsindustrie ziet men o. a. de photographische afbeelding van Gist No. 401, uit het Laboratorium van de Berlijner school. Men denke zich den arbeid en de zorg, welke alleen voor het instandhouden en geheel afgezien van het onderzoek der eigenschappen, van zulke levende collecties, die altijd door in observatie moeten blijven, onvermijdelijk zijn. Overal op biologisch gebied treft ons dit beginsel van uitgebreidheid, van zich in het oneindige verliezende verscheidenheid, en bijna elk biologisch onderzoek heeft betrekking op materiaal, waarin zoodanige differentieering eene rol speelt. Het staat daarmede in verband, dat vele biologische, in het bijzonder op bacteriologisch gebied gelegen verhandelingen, veel van hun waarde missen doordat de organismen, waarop zij betrekking hebben niet wel herkenbaar zijn uit de beschrijvingen, die met onvoldoende systematische kennis waren opgesteld. Geheel onrechtvaardig is het echter om aan Pasteur, die als chemicus en mineraloog slechts een beperkte kennis van het systeem van planten en dieren bezit, in dit opzicht een tekortkoming toe te dichten, gelijk dit in de literatuur veelvuldig geschiedt, want het zijn juist zijne werken die de bewondering van den ingewijde afdwingen door de scherpe, als het ware instinktmatige waardeering, waarmede, daarin met de genoemde moeielijkheid rekening is gehouden. Maar hij gebruikt slechts zelden latijnsche namen voor zijn mikroben en dat brengt sommige critici in de war.

Behalve door den ontzaglijken rijkdom en omvang van het organische leven, wordt de snelle ontwikkeling der Biologie tegengehouden door de Ingewikkeldheid der Levensverschijnselen. Wel hebben bij de opkomst van physika en chemie de groote wijsgeerige schrijvers de blijde verwachting uitgesproken, dat ook de verschijnselen van het leven eenvoudige mechanische verklaringen zouden vinden, hetgeen zoo krachtig uitgedrukt is in den titel van het in 1748 verschenen werk van Lamettrie, »l'Homme machine«, maar tegenwoordig, nu de tippen van den sluier iets verder geligt zijn, en het socialisme het materialisme begint terug te drijven, wordt het van dag tot dag duidelijker, dat er in al wat leeft beginselen werkzaam zijn, welke zich niet physisch en chemisch laten schematiseeren. Hoezeer het volstrekt niet op mijn weg ligt thans in het breede uit te weiden over den strijd tusschen »Mechanisme« en »Vitalisme« welke dientengevolge, maar niettemin onverwacht, in den laatsten tijd opnieuw is ontbrand, zoo wensch ik daarbij toch enkele oogenblikken stil te staan, daar er niets is, waardoor het eigenaardige karakter van de Biologische onderzoekingen, in tegenstelling tot de chemische en physische, scherper aan het licht komt, dan juist door de mogelijkheid van het vernieuwde ontbranden van dien ouden strijd, alsmede door de natuur der strijdige onderwerpen.

Volgens het Mechanisme zijn de eigenschappen van de levende stof het gevolg van de ingewikkelde chemische, physische en morphologische samenstelling er van, en moet de mogelijkheid hunner verklaarbaarheid daaruit erkend worden, evenals het mogelijk is, dat de eigenschappen van het water en het ijs eenmaal zullen ver-

klaard worden uit die van de waterstof en de zuurstof en de ons bekende krachten van de anorganische natuur.

Volgens het Vitalisme zijn er in alle levende wezens, de hoogste zoowel als de laagste, beginselen werkzaam, die zoodanige verklaarbaarheid, bij den tegenwoordigen toestand der wetenschap onmogelijk doen schijnen.

Mechanisten en Vitalisten zijn beide diep doordrongen van de éénheid van het leven. De nieuwere biologische onderzoekingen brengen van jaar tot jaar, van dag tot dag grooter eenstemmigheid in de opvatting, dat niet alleen de hoogere maar zelfs de allerlaagste organismen, dat is de bacteriën, de lagere wieren, de amoeben, de monaden, uit een stof van een uiterst ingewikkelden bouw bestaan, welke uit een chemisch en physisch oogpunt door het gansche organische leven dezelfde samenstelling schijnt te bezitten en ook niet verschilt van de materie, waaruit ons eigen lichaam zich ontwikkelt. Deze stof is het protoplasma, men kan met recht zeggen, dat aan de studie daarvan de Biologische wetenschap in haar ganschen omvang gewijd is. Hoe meer onze kennis van het protoplasma toeneemt, des te grooter en principieeler blijken de verschillen daarvan met alle andere ons bekende niet levende stoffen te zijn, en dieper en dieper slaat de overtuiging wortel van het bestaan eener klove tusschen de doode en de levende natuur, welke bij onze tegenwoordige kennis niet overbrugd kan worden. Wel is waar gelooven de Mechanisten, en het is ook mijn overtuiging, dat het gelukken zal om in de toekomst nog veel lager staande levende wezens te ontdekken dan de eenvoudigste thans bekende, en die de klove zullen kunnen aanvullen, maar wij moeten ons vooralsnog met het geloof aan de mogelijkheid dier ontdekking tevredenstellen. In elk geval moeten de telkens herhaalde pogingen om aan de chemische fermenten of enzymen deze overgangsplaatsing toe te kennen, als mislukt worden beschouwd, reeds om den eenvoudigen reden, dat de eigenlijke hoofdkenmerken van al wat leeft, namelijk de voeding, de groei en de vermenigvuldiging bij de enzymen volkomen ontbreken, hetgeen opzettelijk daartoe genomen proeven met de diastase mij overtuigend geleerd hebben.

De Vitalisten zijn van de éénheid van het leven zoo zeer overtuigd, dat zij zelfs de hoogste, de psychische of zielseigenschappen van den mensch terug meenen te vinden in de levensuitingen de allerlaagste organische schepselen, en de treffende overeenstemming tusschen de eigenschappen van de weefselcellen der hoogere organismen met die van het geheele lichaam der lagere ééncellige wezens, voert hen tot het besluit, dat in elke cel, zoowel in de zenuwcel van de hersenen van den denkenden mensch als in de groene cel van een grasblad, in een gistcel zoowel als in de kleinste bacterie, in het mikroskopische slijmklompje, waaruit het lichaam der amoebe bestaat en in dat van de aan de grens van ons waarnemingsvermogen staande mikromonade, dat daarin overal een psychische factor werkzaam is, waarvan alleen het bestaan zeker is, maar waarvan de diepere studie zich aan alle, ons tot nu toe ten dienste staande onderzoekingsmiddelen onttrekt, en die eerst dan als een voorwerp van wetenschappelijk onderzoek zal kunnen behandeld worden, wanneer het zal zijn gelukt de zielseigenschappen van den mensch door quantitatieve methoden te meten en nader te leeren kennen. Wij zijn daarvan echter nog ver verwijderd, want het eigenaardige karakter van de psychische eigenschappen van ons zelve is daarin gelegen, dat ons de middelen ontbreken, niet alleen om daarvan de kwaliteiten in maat of gewicht uit te drukken, maar zelfs, om door de taal,

daarvan adaequate beschrijvingen op te stellen. Vooralsnog staan wij daar tegenover als de stille beschouwer tegenover de onbereikbare sterren aan den nachtelijken hemel.

De opvatting der Mechanisten verschilt in een belangrijk opzicht van die der Vitalisten, zij zijn overtuigd, dat de groeiende, zich voedende en voor deeling vatbare, in het kort de levende stof, in haar meer eenvoudige gedaante bestaanbaar is zonder zoodanige samengestelde psychische eigenschappen, en dat deze laatste sich langzaam ontwikkeld hebben, nieuw geboren zijn, met het algemeene ontwikkelings- en vervolmakingsproces, waaraan het organische leven in den loop der tijden is onderworpen geweest. Het Verstand dwingt den onbevooroordeelden natuuronderzoeker zich bij de Mechanisten aan te sluiten, zelfs, wanneer zijn Gevoel zich niet door de rede laat breidelen, die hier alleen door de analogie en niet door het directe bewijs overtuigen kan.

Overigens kunnen de vertegenwoordigers van de beide kampen in een andere richting met elkander samengaan: in de overtuiging van den ontzaglijk samengestelden bouw van het protoplasma, waaruit, volgens de thans heerschende meening, zelfs de laagste tot nu toe bekende levende wezens bestaan, en waarin een complex van grondeigenschappen voorkommt, voeding, stofwissel, groei, vermenigvuldiging door deeling, prikkelbaarheid, die geheel vreemd zijn aan de doode stof, en daarin, maar wellicht ook daarin alleen, is de kracht van de vitalistische en de zwakte der mechanistische opvatting van het leven gelegen.

Deze gecompliceerde bouw, in verband met de vele mislukte proeven om organisch leven uit de doode organische stof te doen ontstaan, hebben bij vele der diepste denkers de onoverkomelijkheid van de klove, waardoor de levende wezens van de doode stof zijn gescheiden, als het ware tot een wetenschappelijk geloofsartikel doen worden, waardoor zij zich genoodzaakt hebben gezien eene aannemelijke oplossing te zoeken voor de vraag: Indien het leven hier op aarde niet ontstaat, hoe is het dan hier gekomen? Voor hen, die onbekend mochten zijn met het gelijkluidend antwoord, dat in 1865 door Richter en later door een der grootste leermeesters van onzen tijd, namelijk Sir William Thomson, thans Lord Kelvin, daarop is gegeven, het volgende.

Thomson was in 1871 voorzitter van de British Association, vergaderd te Edinburgh. Hij heeft toen een merkwaardige en zeldzaam inhoudrijke redevoering uitgesproken, die wijd en zijd is bekend geworden onder anderen door zijn beschouwingen over den oorsprong van het leven.

Thomson verklaart volkomen overtuigd te zijn door de gronden, welke Huxley een jaar te voren, als voorzitter der British Association, vergaderd te Liverpool, voor de noodzakelijkheid van het verwerpen der hypothese van de Abiogenesis, dat is van het ontstaan van leven uit de doode stof, en voor de noodzakelijkheid van het aannemen van de theorie de Biogenesis, zooals Huxley het uitdrukt, dat is voor de theorie, dat geen leven zonder voorafgaand leven ontstaat, had aangevoerd. Thomson zegt: »Ik verklaar, dat de bewijsgronden, welke Professor Huxley bijeen heeft gebracht, op mij een diepen indruk hebben gemaakt, en ik ben bereid om aan te nemen, als een artikel van wetenschappelijk geloof, door de gansche wereldruimte en door alle tijden waar, dat het leven uit het leven ontstaat, en uit niets anders dan uit het leven«. Thomson wijst er dan op dat de aarde eenmaal in een gloeiend vloeibaren toestand heeft verkeerd, waarop geen leven kon bestaan.

Toen de aarde, tengevolge van afkoeling bewoonbaar werd, moest daarop dus het leven van buiten worden aangevoerd, en hij treedt in een nadere beschouwing over de wijze, waarop hij zich voorstelt, dat dit door meteorsteenen kan zijn geschiedt, welke hij beschouwt als de verspreiders van het leven door de wereldruimte, gelijk het drijfhout op den oceaan allerlei plantenzaden naar verwijderde eilanden voert. Hij zegt ten slotte: »De hypothese, dat eenig leven werkelijk door fragmenten van de ruïnen van een andere wereld op deze aarde gebracht is, moge wild en visionnair schijnen, het eenige wat ik beweer is, dat die hypothese niet onwetenschappelijk is«. In de editie zijner redevoeringen, welke in 1894 opnieuw is uitgegeven, dus 23 jaar later, voegt hij nog aan de laatste zinsnede toe: »en dat die hypothese niet met recht onwaarschijnlijk kan genoemd worden.«

Natuurlijk heeft deze beschouwing bestrijding uitgelokt. De astronoom Zöllner brandmerkt haar als volkomen onwetenschappelijk. Pasteur zwijgt. Carl Vogt lacht: »Zoo zou dan het organische leven de wandelende jood zijn van de wereldruimte, onzeker en eindeloos rondzwervend van planeet tot planeet.« De beroemde plantkundige Nägeli zegt nog in 1884, toen de theorie der Biogenesis reeds zoovele rijke vruchten had afgeworpen: »het loochenen van het ontstaan van het leven uit de doode stof, staat gelijk met het verkondigen van een wonder«. Maar niemand minder dan Helmholtz heeft het zuiver wetenschappelijke karakter van Thomson's hypothese verdedigd, en indien mannen wier oordeel zooveel gewicht in de schalen der wetenschap legt zich daarvoor verklaren, is het niet vreemd, dat er kringen van geleerden worden gevonden, welke in de »eeuwigheid van het leven« gelooven, zooals vele scheikundigen tegenwoordig gelooven aan de eeuwigheid der chemische elementen.

Vele bacteriënsporen kunnen langdurig in een luchtledige ruimte bij volkomen afwezigheid van water en bij de laagste tot nu toe onderzochte temperaturen levend blijven. Hun voortbestaan als levende kiemen in de ledige wereldruimte gedurende een reeks van jaren, waarvan wij de langdurigheid vooralsnog niet kunnen beoordeelen, is derhalve denkbaar. Een beroemd Duitsch natuurvorscher, de plantkundige Cohn, heeft op grond daarvan de meening uitgesproken, dat in de lucht zwevende bacteriën-kiemen, aan de grens der aardatmospheer gekomen, wellicht met een gedeelte van de atmospheer de aarde kunnen verlaten, en, door de wereldruimte naar andere sterren en planeten gevoerd, daarop gunstige gelegenheid voor verdere ontwikkeling kunnen aantreffen. Het komt mij echter voor, dat de hypothese in dezen vorm nog minder aannemelijk is dan zooals Thomson die heeft opgesteld, daar het moeilijk is om aan te nemen, dat stofdeeltjes van de afmeting van bacteriënkiemen, die duizende malen grooter zijn dan de luchtmolekulen, werkelijk aan de grens van de atmospheer zouden kunnen komen, en nog moeielijker om in te zien hoe zij zich dan geheel van de aantrekking der aarde zouden kunnen losmaken.

Wat de hypothese van Thomson betreft schijnt het mij overigens toe, dat daaraan eerst dan een wetenschappelijk karakter zal kunnen worden toegekend, wanneer zich laat aantoonen, dat de toestand van het latente leven in sommige organische wezens, zoo goed als oneindig lang kan voortbestaan, want het doorloopen, zelfs met planetarische snelheden, van de ontzettende afstanden, waardoor de zonnestelsels van elkander gescheiden zijn, vereischt het aannemen van de mogelijkheid dezer oneindige langdurigheid.

Maar hoe lang kunnen plantenzaden, bateriënsporen, gedroogde raderdiertjes of dierlijke eieren bewaard worden zonder hun levensvatbaarheid te verliezen? Wij weten het niet. Nog voor weinige jaren dachten de meeste plant- en dierkundigen, dat die tijd slechts kort was en hoogstens eenige tientallen van jaren kon omvatten. Maar er zijn altijd twijfelaars geweest en opzettelijke proefnemingen hebben juist in den allerlaatsten tijd overtuigend bewezen, dat de tientallen, onde bijzondere omstandigheden in elk geval tot enkele honderdtallen kunnen worden. Professor Peter te Göttingen ontdekte namelijk, dat in den grond van sommige bosschen, die in lang vervlogen, maar historisch nauwkeurig bekenden tijd, op bouw- en weilanden zijn aangelegd, de zaden van vele onkruiden, die eenmaal op de laatste gegroeid hebben, maar in de schaduw der bosschen niet tot ontwikkeling kunnen komen, kiembaar zijn gebleven en door blootstelling van den grond aan licht en lucht kunnen opkomen. Het feit is verrassend, maar naar het mij voorkomt goed bewezen en van groot praktisch en theoretisch belang.

Het valt niet te ontkennen, dat de opvatting van de éénheid van het leven, door de geheele wereldruimte en door alle tijden, een grootsche gedachte is, en dat zij een tastbaren vorm geeft aan het principieele verschil, dat er schijnt te bestaan tusschen al wat leeft en de doode stof.

Maar welke beslissing de wetenschap ten slotte van dit nog raadselvolle vraagstuk zal uitspreken, hetzij de minder waarschijnlijke van de eeuwigheid van het leven, of de meer aanemelijke van het telkens opnieuw ontstaan daarvan bij de vernieuwde formatie van een wereld, of ook, aanhoudend ontstaan van leven, ook heden nog, rondom ons, langs wegen, welke thans nog niet vermoed worden, — zooveel staat vast, dat uit het praktische oogpunt met de eeuwigheid er van moet gerekend worden. Dit feit is even karakteristiek voor den hedendaagschen toestand der Biologie als het andere, dat vele van de beste denkers op physisch en physiologisch gebied geen middel zien om de krachten der anorganische natuur aansprakelijk te stellen voor de werkingen van het organische leven.

Onze onbekendheid met het wezen der krachten, welke op biologisch gebied de hoofdrol spelen, hebben hier het verkrijgen van praktische resultaten door middel van systematisch en welgericht onderzoek meestal verijdeld. Vooralsnog ligt er in de meeste verschijnselen van het leven iets volkomen onberekenbaars, en de belangrijkste ontdekkingen op dit veld brengen ons door hun aard, door hun schijnbare eenvoudigheid, de vraag op de lippen: waarom eerst thans, de wetenschap scheen daarvoor reeds lang geleden gerijpt te zijn. Gewoonlijk zijn groote nuttige toepassingen hier eerst bereikt nadat een door toeval of door rondtasten in het duister verkregen, meer of minder duidelijk gezichtspunt, geniale mannen met praktischen aanleg, soms onmiddellijk, meestal na langdurig, meer uit grepen dan uit intensieven arbeid bestaand onderzoek op het rechte spoor had gebracht. Eer ik tot de bespreking van de wetenschappelijke beteekenis der Bacteriologie overga, die juist dit meer systematische, dit intensievere onderzoek op het gebied der toegepaste Biologie begunstigt, wensch ik mijn meening door een paar voorbeelden op te helderen. Beide zijn ontleend aan het gebied der plantenziekten, beide zijn van geheel overeenkomstigen aard, de bestrijding van de voor den ooftbouw zoo uiterst nadeelige plantenluizen. Maar welk een verschil in de middelen!

Mijn eerste voorbeeld betreft den gelukkigen onderzoeker die onmiddellijk slaagt.

Het geldt de vernietiging eener op de rijpe vruchten levende schildluis *(Icerya Purchasi)* in de oranjeappelplantages van Florida, welke daardoor met ondergang werden bedreigd. De Amerikaansche regeering zond er den Rijksentomoloog Riley heen. Hij herkende in het schadelijke insect een bewoner van Australië, dat daar eveneens op de oranjeappels leeft, maar zonder schade aan te richten. Hij begeeft zich naar Australië, onderzoekt de leefwijze der schildluis en ontdekt een kevertje, dat zich daarmede voedt en in Florida niet voorkomt. Zou dit kevertje wellicht de oorzaak van de zeldzaamheid der schildluis in Australië zijn? Het kevertje wordt meegenomen en in Florida ingevoerd. Spoedig daarna begint de schildluis uit de plantages te verdwijnen en de oranjeappelcultuur is voor Florida gered. De gelukkige geleerde noemde in de blijdschap zijns harten zijn vijfde dochtertje *Vedalia*, — zoo is de naam van het nuttige kevergeslacht.

En nu het andere geval. Dit laat zich niet in zoo weinige woorden beschrijven. De druifluis *Phylloxera vastatrix)* is een Amerikaansch insekt, dat aan de wortels van den wijnstok leeft. In 1863 is het voor 't eerst in Europa waargenomen en in 1882 waren er alleen in Frankrijk reeds omstreeks 2½ millioen hectaren wijnberggronden totaal door verwoest. Den eersten stap op den weg der bestrijding deed Planchon. Door de waarneming van het feit, dat de wortels der Amerikaansche druiven niet van de druifluis lijden, terwijl deze druiven echter door hunne mindere edele eigenschappen onmogelijk de fransche kunnen vervangen, kwam hij op de gedachte om de fransche variëteiten op amerikaansche wildlingen te enten. De verkregen planten waren bestand tegen de druifluis, — maar zij waren niet bestand tegen het fransche klimaat.

Toen werd aan den plantkundige Millardet, door de Phylloxeracommissie van de Akademie von Wetenschappen te Parijs, de opdracht gegeven om in Amerika druivensoorten op te sporen, welke het fransche klimaat wel konden verdragen. Millardet deed met dat doel een reis door de Vereenigde Staten en keerde met de *Vitis Riparia* terug. De fransche druiven werden daarop geënt en de verkregen planten waren bestand zoowel tegen de druifluis als tegen het fransche klimaat, — maar zij bleken niet bestand zijn tegen het hooge kalkgehalte van meer dan 1 millioen hectaren der fransche wijnbergen.

Daarom werd in 1878 Viala uitgezonden. Hij kreeg de opdracht om een kalkminnende amerikaansche druif te zoeken, tevens bestand tegen de druifluis en tegen het klimaat van Frankrijk.

Viala bracht uit Texas de *Vitis Berlandièri* mede, die wel is waar aan alle gestelde eischen voldeed, maar in een niet verwachte richting te kort schoot, — de vegetatieve verwantschap daarvan tot de fransche druiven was zoo gering, dat daarop onmogelijk kon geënt worden, zoo dat hare ontdekking nutteloos dreigde te worden.

Maar toen kwam Millardet op nieuw te hulp en zette de kroon op het werk door ook deze moeielijkheid weg te ruimen: Hij voerde de hybridisatie van *Vitis Berlandièri* in, om de te geringe vegetatieve verwantschap daarvan tot de europesche druiven in de hybriden te verhoogen. Hij bestoof daartoe de gecastreerde bloemen van die soort met het stuifmeel der fransche variëteit *chasselas*. Er ontstonden vruchten met kiembare zaden, waaruit bastaarden opkwamen met groote vegetatieve verwantschap tot de fransche variëteiten, welke daarop gemakkelijk konden

geënt worden en planten opleverden bestand tegen de druifluis, bestand tegen het klimaat, bestand tegen een gehalte van 23 tot 65% koolzure kalk in den bodem. Van dat oogenblik af aan staat het vast, dat alle wijngaarden van geheel Frankrijk met zekerheid kunnen geregenereerd worden, zoodat een der rijkste bronnen van welvaart voor dat land gered is.

Ik heb deze twee voorbeelden gekozen omdat zij naar mijn oordeel op karakteristieke wijze de biologische wetenschap illustreeren. Hoe eenvoudig in schijn, hoe uiterst gecompliceerd in werkelijkheid zijn de toegepaste middelen! Uit welke theorieën van de structur en de eigenschappen van de levende stof zal zich ooit zoodanige oplossing van een biologisch vraagstuk vooraf laten voorspellen of berekenen? Terecht heeft de fransche anatoom Bichat gezegt: »Le propre des phénomènes de la vie est de se soustraire à tout calcul«. Een wetenschap, die op zulk een vreemde en onzekere wijze tot hare de maatschappij belangrijkste resultaten komt, wordt als het ware alleen door de ingewijden als wetenschap waargenommen en kon moeielijk in de eigenlijke beteekenis van het woord populair worden.

Dit standpunt heeft de Biologie dan ook eerst in den allerlaatsten tijd bereikt en ongetwijfeld heeft de Bacteriologie veel daartoe bijgedragen.

Ontstaan als een verwaarloosd deel der plantkunde, en vóór het jaar 1880 nog niet eens als zelfstandige wetenschap benoemd, is deze jongste tak der Biologie plotseling op den voorgrond getreden door hare uitgebreide diensten op medisch gebied en voor het praktische leven. Daarnaast bezit zij nog een andere eigenschap, welke naar het mij voorkomt vooraf onder Uwe aandacht verdient gebracht te worden. Ik bedoel hare groote beteekenis voor het onderwijs in en voor de beoefening van de biologische wetenschap in het algemeen.

De Bacteriologie heeft hare wording te danken aan, haar eigenlijke kracht is gelegen in de strenge en juiste toepassing van physiologische methoden van onderzoek. Ik moet mij veroorloven hier enkele oogenblikken bij het geven van een definitie stil te staan. Wat is physiologisch, waardoor onderscheidt biologisch zich van physiologisch onderzoek? Dit zal door het volgende voorbeeld duidelijk worden.

De werktuigkundige, die volledige kennis van een bepaald stoomwerktuig wenscht te erlangen, moet daartoe drie onderzoekingswegen volgen: een weg van Historisch, een weg van Statisch, een weg van Dynamisch onderzoek. De historie der machine omvat alles wat betrekking heeft op hare wording; het meeste daarvan bestaat uit de gedachtebeelden van de uitvinders en constructeurs van vroeger tijden, het overige kan alleen van den leverancier worden vernomen. Het statisch onderzoek maakt bekend met alle onderdeelen der geheel uit elkander te nemen machine; de vuren moeten voor dat onderzoek worden uitgedoofd. Maar voor het dynamisch onderzoek moeten de kolen branden; de transformatie der energie, het bewegingsdiagram, het nuttigeffect der kolen, kunnen niet met uitgebluschte haarden worden bepaald.

Evenzoo de bioloog. Zijn object is het levende object, en alle deelen er van in levenden en dooden toestand. Ook zijn onderzoek ist drieledig. Zijn Historisch onderzoek bestaat in het vaststellen der systematische verwantschap, waartoe de voorouders en de verwanten van het voorwerp zijner studie moeten spreken, en in het bepalen der levenscondities, waaraan dat bepaalde voorwerp onderworpen is geweest en die uit de plaats van het voorkomen kunnen afgeleid worden. Boven werd op de beteekenis van dit deel van zijn taak reeds gewezen.

Zijn Statisch onderzoek kan worden uitgevoerd, nadat het voorwerp is gedood, langs anatomischen, chemischen physischen weg.

Zijn Dynamisch onderzoek heeft betrekking op de krachten van het leven zelve; wie deze wil leeren kennen zal niet beginnen met het leven in den drager te vernietigen.

De Biologie in het algemeen bestaat uit de vereeniging dezer drie richtingen, de Physiologie is dat gedeelte er van, dat zich met het Dynamische onderzoek bezighoudt. De Physiologie zou Dynamische Biologie kunnen genoemd worden.

Het is de aanwezigheid van deze physiologische richting in een biologisch onderzoek, welke daarop den karakteristieken stempel drukt, en aan het meer en meer op den voorgrond treden daarvan op mikroskopisch gebied, is een groot deel van den vooruitgang te danken, waaraan in den laatsten tijd de meeste takken van de wetenschap van het leven hebben deelgenomen.

Wij keeren daarmede tot de Bacteriologie terug, wier kracht is gelegen in stelselmatig genomen proeven, berustende op de juiste en strenge toepassing van physiologische onderzoekingsmethoden. Daardoor is de erkentenis verworven van de rol, welke de mikroskopische wereld speelt in tal van richtingen, waar hare aanwezigheid, zelfs door de geleerden vroeger nauwelijks vermoed, hare groote beteekenis door ieder met verrassing is waargenomen. De Bacteriologie is zoodoende tot een belangrijk onderdeel der Biologische wetenschap in het algemeen geworden en het is voor eenige besprekingen van hare beteekenis in dat opzicht, dat ik thans Uw aandacht heb te verzoeken.

Dit onderwerp blijkt bij nadere beschouwing omvangrijk te zijn. Het is inderdaad opmerkelijk hoe groot het getal vragen van algemeen biologisch belang is, welke, overgebracht op bacteriologisch gebied in scherpte winnen, beantwoording veeleer mogelijk doen schijnen, dan zoolang zij gesteld worden ten opzichte van de hoogere planten en dieren. De reden van deze belangrijke omstandigheid ligt in de gemakkelijkheid, waarmede door toepassing der bacteriologische voorschriften allerlei mikrobensoorten, kunnen verkregen worden, die de dragers zijn van physiologische eigenschappen, welke men vroeger alleen kende bij cellen, deeluitmakende van weefsels van samengestelden bouw bij hoogere organismen en slechts uiterst moeielijk voor experimenteel onderzoek toegankelijk. Alle mikroben zijn éénzellige wezens, — cellen in de meest eenvoudige gedaante. Hun levensleer is derhalve celphysiologie, en zoodoende wordt ons het naast bereikbare ideaal van de physiologie der hoogere wezens, dat ook niets anders is dan celphysiologie, bij het bacteriologisch onderzoek nader gebracht. De grootere eenvoudigheid, waarmede bacteriologische proeven van essentieel biologisch belang kunnen genomen worden, de minder omvangrijke kennis, daartoe vereischt dan voor de uitvoering van overeenkomstige proeven met hoogere organismen, verzekeren ongetwijfeld aan de Bacteriologie in de toekomst vele leerlingen, en er is voor de vordering eener wetenschap niets van zoo groot belang, als de deelneming daaraan door vele, omdat daardoor de ontdekking van nieuwe feiten verhaast, belangrijke gezichtspunten het eigendom van ruimere maatschappelijke kringen worden. Bovendien geeft eerst de gang door vele hoofden en vele zinnen, die alle iets weten te wijzigen of te volmaken, dien stempel van voltooiing aan een nieuw denkbeeld, noodzakelijk om daaraan waarde voor het praktische leven mede te deelen. In het kort, zij is daardoor

als het ware geschapen om het jongere en opkomende geslacht in de wetenschap aan het leven in te wijden, dat wil zeggen de Biologie even populair te doen blijven als zij dit ook juist door de Bacteriologie is geworden.

Maar ter zake.

Welke dan zijn de levensverschijnselen, gemeenzaam aan de hoogere en de lagere organismen, wier studie door de Bacteriologie in nieuwe richtingen of op eenvoudiger wijze mogelijk wordt gemaakt?

Levensprocessen van den meest verschillenden aard, even gewichtig voor de theorie als voor de praktijk, trekken onze aandacht. Ik wil trachten enkele daarvan vluchtig te schetsen.

Voorzeker moet hier in de eerste plaats gedacht worden aan den Groei en de Vermenigvuldiging, dat is aan de twee meest karakteristieke, direct waarneembare eigenschappen van al wat leeft. Met den groei en de vermenigvuldiging der levende wezens hangt alles, wat betrekking heeft op de Erfelijkheid en de Veranderlijkheid hunner eigenschappen ten nauwste samen. Het kan, naar het mij toeschijnt, moeielijk ontkend worden, dat deze problemen, waarvan de theoretische en de experimenteele behandeling bij de hoogere wezens op zulke groote moeielijkheden stuit, op bacteriologisch gebied overgebracht in hooge mate aan eenvoudigheid en duidelijkheid winnen. Ik behoef hier alleen slechts te wijzen op de snelheid, waarmede de bacteriën-generaties op elkander volgen, vergeleken met die bij de hoogere wezens.

Het laat zich verder ook niet ontkennen, dat bij sommige bacteriën, wijzigingen in de uiterlijke levensvoorwaarden diepere veranderingen teweegbrengen in de erfelijke eigenschappen, dan men dit ergens bij de hoogere organismen heeft waargenomen, en dat het derhalve wel de bacteriën zullen zijn, welke de eerste steenen zullen aandragen voor de opstelling eener theorie van de veranderlijkheid, tot nu toe bijna geheel en al door de scheppingen der verbeeldingskracht wordt gedragen. En dat ik hierbij volstrekt niet spreek over gezichtspunten, welke alleen van theoretisch belang zijn, zal ieder erkennen, die in de vaccins, welke Pasteur en vele onderzoekers na hem door warmte of op andere wijze, uit virulente bacteriën hebben voortgebracht, en in de veranderingen, welke sommige bacteriën, bijv. de industrieele melkzuurfermenten bij de fabriekmatige processen ondergaan, de eerste aanwijzingen van een waarlijk physiologische behandeling van het variabiliteitsvraagstuk zien. In het kort alles doet denken, dat in de theorie van de erfelijkheid en de veranderlijkheid, dat is in de twee problemen, welke door vele biologen als de grootste en diepste hunner wetenschap worden beschouwd, nieuw leven zal worden gebracht door de Bacteriologie, en dat zij als het ware geroepen schijnt te zijn, om de overbrugging te vormen tusschen de historische, de statische en de dynamische Biologie, dat is tusschen de drie hoofdrichtingen, waarin zich deze wetenschap voortbeweegt.

Het kost mij moeite om van dit belangrijke onderwerp thans reeds af te stappen, maar wij moeten verder.

Het ademhalingsproces, gemeenzaam aan al wat leeft, laat zich door bacteriologische proeven langs nieuwe wegen onderzoeken en de vroeger daarover heerschende meeningen en beschouwingen, hebben dientengevolge diep ingrijpende veranderingen ondergaan. Daarvan enkele voorbeelden.

Bij alle schijnbare willekeur, welke het organische leven overal ten toon spreidt, moet aan de wet van het behoud der energie worden voldaan. De mechanische,

chemische, physische, psychische werkingen in ons, en rondom ons in de levende natuur, mogen diep verborgen in hun oorsprong en raadselachtig in hun uitwerkingen zijn, energie wordt daarbij niet uit niets geboren. Het celmechanisme werkt voorzeker op tooverachtige wijze met de toegevoerde krachten, maar zonder aanhoudende toevoer daarvan wordt het als het stoomwerktuig met uitgebluscht vuur. Van waar verkrijgt de cel de energie noodzakelijk voor hare veelzijdige arbeidsverrichtingen? Wij weten het, uit het voedsel, maar hoe? Een eeuw geleden heeft Lavoisier op deze vraag in praktischen zin, maar natuurlijk zonder de kennis van het verband daarvan met de wet van het behoud der energie, het antwoord gegeven en in de weefselademhaling of de physiologische verbranding, dat is in de uitwisseling van koolzuur en water tegen van buiten opgenomen zuurstof, den oorsprong van de krachten van de levende cel aangewezen. Tot aan het jaar 1860 was nauwelijks door eenig bevoegd denker op de algemeenheid van de ontdekking van Lavoisier een uitzondering vermoed, tot zoolang kan men zeggen, dat in de zuurstofbehoefte voor de weefselademhaling een natuurwet is gezien, welke zich over al wat leeft scheen uit te strekken. Maar omstreeks het genoemde jaar is door Pasteur de anaërobiose, dat is de mogelijkheid van het leven zonder vrije zuurstof ontdekt en in het gistingsproces een energiebron aangewezen, welke tot zekere hoogte het ademhalings proces kan vervangen. Anaërobiose en gisting zijn bij uitnemendheid bacteriologische werkingen, zoodat de theoretische opvatting omtrent de bron van energie voor alle levensprocessen, dat is de eigenlijke grondslag der physiologische wetenschap, door een bacteriologische ontdekking van vorm veranderd is. Evenals de meeste ontdekkingen van Pasteur is die der anaërobiose ééne van merkwaardige vruchtbaarheid, en zij geeft tot een lange reeks van meer of minder samengestelde proeven aanleiding, alle in hooge mate leerrijk. Bij de vele onderzoekingen, welke dienaangaande reeds verricht zijn, zijn tal van gradatien bekend geworden, tusschen de groote zuurstofbehoefte der cellen van de hoogere planten en dieren, en de, naar het schijnt volkomen onafhankelijkheid van dit gas bij andere organismen bijv. bij de melkzuurfermenten, welke evengoed functioneeren en groeien, wanneer de lucht kan toetreden als bij volkomen afsluiting er van. Bovendien zijn er een aantal bacteriën ontdekt, wier groei en wier levensuitingen door de aanwezigheid van zuurstof benadeeld, of zelfs geheel tegengehouden worden en daaronder vele soorten van groot praktisch belang. Onderwijs en onderzoek hebben zoodoende omvangrijk materiaal ter beschikking gekregen, evenzeer uitmuntende door de hooge wetenschappelijke als door de praktische beteekenis van de daaraan verbonden vragen. Maar hier ligt een in menig opzicht onontgonnen veld, waarvan de vruchten nog slechts ten deele bekend zijn.

Het zijn overigens volstrekt niet alleen deze afwijkende uitingen van het ademshalingproces, welke zich zoo uitnemend verleenen voor proefneming zoowel voor den beginner als den meer gevorderden onderzoeker, ook het normale verloop daarvan, volgens het schema van Lavoisier, laat zich door de bacteriologie langs geheel nieuwe wegen bestudeeren. Een dezer wegen, in het jaar 1875 in een verhandeling over langzame verbranding en phosphorescentie bij levende organismen door den physioloog Pflüger aangewezen, maar eerst door de ontwikkeling der bacteriologie begaanbaar gemaakt, berust op het feit, dat bij vele levende wezens naast of in plaats van de warmteontwikkeling, welke een standvastig begeleidster van het

ademhalingsproces is, een grooter of kleiner deel der hierdoor gevormde energie als licht vrij wordt, dat de ademhalingsfunctie direct zichtbaar en met eenige nauwkeurigheid meetbaar maakt. Ofschoon de licht-functie in de organische wereld wijd verspreid is en bij vertegenwoordigers van de meest verschillende klassen van dieren en planten voorkomt, hebben toch alleen de lichtbacteriën een stelsel van eigenschappen, welke een systematische studie van den physiologisch-chemischen kant daarvan veroorloven, en het is verrassend zich te overtuigen van de eenvoudigheid der proeven en de zekerheid der resultaten, wanneer de lichtbacteriën het materiaal uitmaken voor het onderzoek, bijv. van het verband van het ademhalingsproces met den aard van het aangeboden voedsel, vergeleken met vele verwikkelingen, welke deze studie met zich brengt bij de hoogere lichtende organismen.

Uit het oogpunt der arbeidsvoortbrenging is de lichtfunctie nog in zoover merkwaardig, dat daarbij een buitengewoon groot gedeelte van de chemische energie der door de ademhaling verbrande stoffen in licht kan worden omgezet, terwijl bij gewone lichtbronnen het nuttig effect steeds, door de gelijktijdige warmteontwikkeling zeer belangrijk verkleind wordt. Maar hoewel in sommige streken van Midden-en Zuid-Amerika lichtkevers van het geslacht *Pyrophorus*, welke ook bij ons in warme kassen gekweekt kunnen worden, feitelijk als lantaarns gebruikt worden, doen de proefnemingen van Tesla de practici tegenwoordig naar een geheel ander terrein dan naar het organische leven den blik richten om het licht van de toekomst waar te nemen.

Het ademhalingsproces der bacteriën heeft aan Professor Engelmann te Utrecht tot het nemen van belangwekkende proefnemingen op mikroskopisch gebied aanleiding gegeven.

Engelmann is de ontdekker van het feit, dat vele bacteriën in het mikroskopische preparaat plotseling ophouden te bewegen bij zuurstofonttrekking om even onmiddellijk weder te gaan bewegen bij vernieuwde zuurstoftoetreding. De kleinheid van vele bewegelijke bacteriën in aanmerking genomen, was daarmede een mikroskopisch reactief op vrije zuurstof gevonden van aan het fabelachtige grenzende gevoeligheid. Zoo zegt Engelmann: »Zuurstofhoeveelheden die zeker geringer zijn dan een honderdbillioenste milligram kunnen daardoor nog gemakkelijk worden aangetoond, en het is zelfs niet onwaarschijnlijk, dat de kleinste met zekerheid aan te toonen zuurstofhoeveelheden gelegen zijn binnen de grenzen, welke de theoretische physika voor het gewicht van het zuurstofmolekuul leert berekenen«.

Engelmann heeft van zijn ontdekking gebruik gemaakt om de zuurstofafscheiding in het licht door groene plantendeelen en door lagere groene organismen te bestudeeren. Hij bracht daartoe de te onderzoeken groene cellen tegelijk met bewegelijke bacteriën in het mikroskopische preparaat en toonde aan, dat de beweging rondom de groene voorwerpen ophield in het duister en op nieuw begon bij toetreding van licht, waardoor het verband tusschen lichtkleur en bladgroen-functie vast kon gesteld worden en waarbij bleek, dat met den voornaamsten absorptieband van het bladgroen-spectrum, welke tusschen de Frauenhofer'sche spectraallijnen B en C gelegen is, ook juist de plaats van de sterkste zuurstofafscheiding samenvalt. Dit was in strijd met de toenmaals, in 1881, heerschende opvatting maar de juistheid is later op andere wijze bevestigd geworden.

Aan den eenen kant bewondert men in deze proeven de eenvoudigheid der mid-

deelen, waardoor zulk een belangrijk wetenschappelijk resultaat is verkregen, aan den anderen kant de ontdekking eener zoo fijne bewerktuiging van het bacteriënlichaam, dat instaat blijkt te zijn opgeloste zuurstofhoeveelheden te herkennen van de straks genoemde orde, en daarop reageert door het uitvoeren van richtingsbewegingen, die niet wel door mechanistische beschouwingen te verklaren zijn en ons schijnen te noodzaken, het bestaan van de psychische eigenschap der gewaarwording, reeds in de materie der kleinste bewegelijke bacteriën aan te nemen.

De warmte bij het ademhalingsproces der mikroben ontwikkeld, is onlangs op een eigenaardige wijze practisch toegepast voor de verwarming van den grond in plantenkassen.

Het broeien van hooi, van mest, van tabak en andere dicht in elkander gedrukte organische stoffen, berust op twee gansch verschillende processen. Ingeleid wordt de warmteontwikkeling door het leven. De physiologische verbranding namelijk, welke in het lichaam van de, in de genoemde stoffen aanwezige, snelgroeiende mikroben plaats grijpt, gaat met warmteontwikkeling gepaard, welke tot omstreeks 50° C., volgens sommige waarnemers in broeienden tabak zelfs tot 70° C. stijgen kan. Deze temperatuursverhooging is voldoende om tot chemische oxydatie van allerlei bestanddeelen aanleiding te geven, waarbij de warmteontwikkeling voortgaat en de temperatuur meer en meer stijgt, de mikroben gedood worden en ten slotte zelfontbranding volgen kan.

Van de eerste phase van dit proces wordt nu op de volgende wijze gebruik gemaakt: Ruw katoen, direct uit de balen afkomstig en niet gereinigd, is in vochtigen toestand sterk aan broeien onderhevig. Het wordt in bloempotten gedaan en goed aangedrukt. Door een weinig water wordt de geheele massa min of meer vochtig gemaakt en de bloempotten worden in den te verwarmen grond gegraven. De onzuiverheden van het katoen vormen het voedsel van de in de massa verspreide levende organismen, deze beginnen zich te vermenigvuldigen en hun ademhaling ontwikkelt warmte. Door nu en dan een weinig water in de potten te doen, kan de warmteontwikkeling weken lang voortgaan. Worden de levende organismen vooraf in het katoen vernietigd, dan is er van temperatuurstijging ook na bevochtiging niets te bespeuren.

Ten nauwste in samenhang met de ademhaling staan eenige oxydatieprocessen, welke op de zoogenoemde »zuurstofoverdraging« door de levende cel berusten. Zij zijn bij de hoogere organismen onafscheidelijk met allerlei andere ingewikkelde physiologische processen verbonden, maar zij worden op Bacteriologisch gebied door verschillende meer eenvoudige werkingen zooals de nitrificatie, de azijnvorming, het vermolmen en vergaan voor onderzoek toegankelijker gemaakt. Hetzelfde geldt ten aanzien van de reductie-functie.

Maar laat ons thans van het ademhalingsproces afstappen en een ander hoofdstuk van de Biologie beschouwen, waar de Bacteriologie begint nieuw licht op te werpen en grootere uitbreiding aan te geven. Ik heb hier de Enzymologie op 't oog, dat is de leer der enzijmen of chemische fermenten, waarvan de meest gewone, namelijk de diastase uit mout, de invertine uit biergist, de pepsine uit het maagsap, de trypsine uit het buikspeeksel en het lebferment uit de kalfsmaag U bekend zullen zijn. Evenals vele mikroben aan bepaalde stoffen geadapteerd zijn, zooals gistsoorten aan de suikers, de influenza-bacil aan de haemoglobine, het nitraatferment aan nitrieten, sommige rottingsbacteriën aan de peptonen, — zoo ook de

enzymen, die op grond daarvan in eiwitenzymen, suikerenzymen, zetmeelenzymen, glukosidenzymen kunnen onderscheiden worden. De overeenkomst der enzymen, die niet anders dan in water meer of min oplosbare chemische lichamen zijn, met lagere organismen is zoo groot, dat nog betrekkelijk kort geleden sommige chemismen, welke door bacteriën worden veroorzaakt, aan de werking van enzymen werden toegeschreven, zoo bijvoorbeeld de melkzuurvorming uit melksuiker door contact met den maagwand der herkauwers. Het is inderdaad niet te ontkennen, dat men zich geen juister voorstelling van de werking der melkzuurfermenten op suiker kan maken, dan door zich te denken, dat er in het bacteriënlichaam een enzym opgehoopt voorkomt, dat daaruit niet in vrijen toestand naar buiten kan komen, maar in het lichaam der bacterie de naar binnen gedrongen suiker op overeenkomstige wijze omzet als bijvoorbeeld de diastase dit doet bij het zetmeel. Van een chemisch standpunt gezien kan men zich van de levende stof, waaruit zoowel het lichaam der bacteriën als het protoplasma van de cellen der hoogere wezens is opgebouwd, zelfs een vrij juiste voorstelling vormen door zich die te denken als een aggregaat van onoplosbare enzymen. Hierdoor wordt echter alleen de werking van de cel op de stoffen daar buiten eenigermate verklaard, groei en deeling tengevolge van voeding blijven daarbij even raadselachtig als zonder de genoemde voorstelling, want juist deze eigenschappen ontbreken bij de enzymen, wij zagen het reeds vroeger, geheel en al.

Het zal U bekend zijn, dat de scheikundigen er tot nu toe niet in geslaagd zijn om de chemische natuur der enzymen vast te stellen. Het is zelfs nog niet gelukt met zekerheid uit te maken of deze lichamen al of niet stikstofhoudend zijn, en de reden dezer onzekerheid ligt in den aard van het voorkomen der enzymen in plantenweefsels of in dierlijke sappen, bij tegenwoordigheid van vele bekende en onbekende stoffen, van welke de volledige scheiding onmogelijk is geweest. Nu laat het zich aanzien, dat de Bacteriologie tot de oplossing van dat vraagstuk zal kunnen bijdragen. Sommige enzymen, bijv. de trypsine en de diastase zijn namelijk het product van bacteriën en schimmels, wier cultuur in voedingsvloeistoffen van betrekkelijk eenvoudige en goed bekende samenstelling mogelijk is en die, daarin groeiende de betrokken enzymen kunnen afscheiden. Deze hoopen zich dan langzamerhand in de cultuurvloeistoffen op en wel in tegenwoordigheid van geheel andere lichamen dan waarmede zij bij vroegere onderzoekingen gemengd voorkwamen. Ook hierbij moet men zich de moeilijkheid echter niet te gering denken, want meestal zullen andere afscheidingsproducten tegelijkertijd worden gevormd en zich met de enzymen ophoopen. Intusschen is hier ontegenzeggelijk een veld van onderzoek geopend dat resultaten belooft.

Uit een praktisch oogpunt verdient het opmerking dat de eiwitenzymen der mikroben niet alle aan elkander gelijk zijn, zoodat er dus ook onder moeten voorkomen, welke van de trypsine van ons buikspeeksel verschillen. De vraag rijst of deze afwijkende enzymen wellicht nuttig zullen blijken te zijn, door het vermogen om eiwitachtige stoffen in producten om te zetten weldadig voor onze organisatie. Mocht dit het geval wezen dan openen de bacteriologische cultuurmethoden den weg om deze lichamen in iedere gewenschte hoeveelheid te bereiden. — Sprekende over de eiwitenzymen der mikroben kan ik niet nalaten op het opmerkelijke feit te wijzen, dat nog door geen enkelen onderzoeker gewag is gemaakt van pepsine als afscheidingsproduct van het mikrobenleven. Is dit slechts toeval en het gevolg van de moeilijkheid om

dit enzym aan te toonen? of zou de pepsine een stof zijn, die werkelijk alleen door hoogere organismen wordt voortgebracht? De toekomst zal wel spoedig op die vragen het antwoord brengen, want ook op dit gebied ontbreekt het niet meer aan onderzoekers.

De tijd verbiedt de andere kanten van ons onderwerp op gelijke wijze te overzien, zelfs die te noemen. De gekozen voorbeelden mogen U eenig denkbeeld gegeven hebben van de beteekenis der Bacteriologie voor de beoefening van de Biologische wetenschap in het algemeen.

De toepassingen der Bacteriologie liggen op medisch, hygiënisch, landbouwkundig en industriëel gebied. Hare hooge praktische beteekenis laat zich reeds gemakkelijk afleiden uit het feit, dat zij door hare veelzijdige diensten voor de zieke en gezonde menschen- en dierenwereld, in een zoo kort tijdsverloop als omstreeks 20 jaren in den volsten zin des woords populair is geworden, bijna even populair als de scheikunde, waarvan de overeenkomstige ontwikkelingsperiode een omstreeks vijfmaal langer tijdperk omvat, want wat Lavoisier is geweest voor deze wetenschap dat was Pasteur voor de Bacteriologie.

Op het gebied van de hygiëne heeft zij een ware revolutie teweeggebracht: Zij heeft daaraan een wetenschappelijken grondslag gegeven, en zoodoende éénheid van gevoelen op de internationale hygiënische conferenties bereikbaar gemaakt. De rol, welke zij daardoor in onze maatschappij is begonnen te spelen, leert men waardeeren door te denken aan de statistiek van de arbeidsuren, welke door het voorkomen van ziekten voor het algemeene nut bewaard blijven. Tegenwoordig zijn de deskundigen het er bijvoorbeeld over eens, dat het beperkt blijven van de Hamburger cholera-epidemie van 1892 tot een relatief klein gebied, te danken is aan de kennis van de eigenschappen van de cholerabacterie en dat, zonder de afdoende hygienische maatregelen, welke voor een groot deel op grond van die kennis genomen zijn, die epidemie zich toen over Noordelijk Europa zou hebben uitgebreid. Als men zich van deze omstandigheid rekenschap geeft, moet dan niet de ontdekking van de cholerabacterie als een der belangrijkste praktische ontdekkingen beschouwd worden? en geven niet alle, die daarin slechts een interressant wetenschappelijk feit zien, het bewijs van ongeschiktheid om de werkelijke beteekenis eener ontdekking te beoordeelen?

Er zijn nuttige en er zijn schadelijke mikroben. Bij het onderwijs aan de Polytechnische School zal het geoorloofd zijn aan de nuttige de eer toe te kennen, welke daaraan toekomt, zij in 't bijzonder zullen onze aandacht tot zich trekken. In den strijd om het bestaan, die in de mikrobenwereld, door het ingrijpen van den mensch met meer hardnekkigheid gestreden wordt dan ergens anders, zullen in den loop der tijden de nuttige overwinnaars blijven. Lang zullen het diphteritisserum en de tuberculine obsoleet, de cholera- en de typhus-bacterie fossiel zijn geworden, wanneer nog gistsoorten in de meest verschillende variëteiten in onmetelijke hoeveelheid zullen worden aangekweekt ten nutte der industrie; — wanneer fabrieken van melkzuurfermenten zullen verrezen zijn om aan de behoefte der zuivelfabrikanten te voldoen; — wanneer pigmentbacteriën in het oneindige zullen worden vermeerderd om zekere kleurstoffen voort te brengen; — wanneer de nuttige eigenschappen van de organismen der ammoniakvorming en van de nitrificatie de productie daarvan in het groot zullen hebben uitgelokt; — wanneer de bacteriënenzymen beter bekend, de voortbrengers der bruikbare daaronder op den voorgrond getreden zullen zijn; — wanneer

er mikrobenfabrieken zullen bestaan waar een aantal voor wetenschap en onderwijs gewichtige soorten op groote schaal aangekweekt worden. De medische Bacteriologie is die van het heden, de polytechnische die van het heden en de toekomst. Maar terug tot het tegenwoordige alleen.

Onze wetenschap omvat de theoretische grondslagen van de verschillende gistingsindustrieën, en van de meest verschillende takken der landbouwtechnologie; zij geeft de verklaring van vele processen in gebruik bij de leerlooierij, de tabaksbereiding, de voorbereiding der spinvezels; zij grijpt in bij de zuivelbereiding, bij den veldarbeid, bij de veehouding; zij vormt de rationeele basis voor de beoordeeling der eischen, welke gesteld moeten worden aan de watervoorziening en de kanalisatie der steden; zij leert hoe bederf en rotting zijn te voorkomen, hoe levensmiddelen moeten worden geconserveerd.

Zij maakt ons bekend met de alomtegenwoordigheid van sommige, met de plaatsen van het voorkomen van andere voor den mensch en voor de samenleving schadelijke of nuttige kiemen: zij leert de middelen om deze kiemen niet alleen te ontdekken maar om ze af te zonderen, om ze tot in het onbegrensde te vermenigvuldigen en te noodzaken hun verborgen krachten in overeenstemming met onzen wil te doen arbeiden. Zij heeft niet alleen de mikroskopische wereld van onbekende en van niet vermoede kanten aan den menschelijken geest geopenbaard, zij heeft bovendien de middelen aan de hand gedaan om de weldaden, welke die mikroskopische wereld ons verschaffen kan te vermeesteren, de ellende welke zij kan veroorzaken te beheerschen. Zij heeft onze macht over de werkingen van het leven ontzaglijk uitgebreid.

Voor ieder die de erkentenis van nieuwe en diepe waarheden van gewicht rekent voor de praktijk, heeft de Bacteriologie een grootschen taak vervuld, want zij heeft juistere inzichten aangaande den oorsprong van het leven voortgebracht.

Voor ieder die in de vermeerdering van onze kennis een bron van vooruitgang, van vermeerdering van maatschappelijk geluk erkent, is zij een weldadige wetenschap, want zij verschaft de middelen om die kennis met snelle schreden voorwaarts te drijven. En hij die in het onderwijs een der hoofdfactoren van de uitbreiding der beschaving ziet, begroet in de Bacteriologie een nuttige nieuweling in de bondgenootschap der experimenteele wetenschappen, want zij geeft een verrassenden eenvoud aan vroeger slechts door ingewikkelde middelen uittevoeren proefnemingen en kan de daaruit te trekken leeringen zoodoende tot het eigendom van velen maken.

Sprak ik hier alleen tot hen, die de vlucht, welke onze wetenschap in de laatste jaren genomen heeft door tijdschriften en dagbladen van stap tot stap hebben kunnen volgen, dan zou ik het geven dezer algemeene opsomming als onnoodig hebben beschouwd. Heb ik niet reeds gezegd dat de Bacteriologie populair is? en sluit dit niet in zich: de sympathie van het volk, verworven door goede diensten, alom bekend? Maar ik wend mij in de eerste plaats tot de jongeren onder ons, die het ontstaan dezer zaken niet mede hebben doorleefd en voor wie een overzicht van het nieuw ontsloten gebied wellicht niet onbelangrijk is, de vluchtige behandeling van enkele toepassingen nutteloos zou zijn.

En wanneer ik ten slotte tot u M. H. S. in het bijzonder een woord richt, dan is het om aan de in mij levendige hoop uitdrukking te geven, dat het mij zal gelukken zoodanige belangstelling bij mijn toehoorders op te wekken in de wetenschap, die ik de eer heb hier te gaan vertegenwoordigen, dat in U het verlangen zal ontstaan tot de

praktische beoefening daarvan. Het zal U dan spoedig duidelijk worden, dat de Biologie in het algemeen en de Bacteriologie in het bijzonder, bij al den schijnbaren eenvoud van haar resultaten, uiterst subtiele wetenschappen zijn, waarbij elke proefneming als het ware tusschen zeer enge grenzen moet genomen worden, en waarbij veel inspanning gevorderd wordt van onze zintuigen, van ons waarnemings-en van ons voorstellingsvermogen, om tot duidelijke en afdoende gevolgtrekkingen te komen. Maar dat zal niet verhinderen, dat het U daarbij tevens zal blijken, dat de wetenschap van het leven in hooge mate aantrekkelijk is; en zij die de volharding zullen bezitten om de eerste moeielijkheden te overwinnen, en de noodige kennis van concrete feiten te verzamelen, zonder welke alle onderzoek onmogelijk, alle theorie een dood geheel blijft, zullen een rijk loon wegdragen voor de moeite en den tijd ten offer gebracht aan het najagen van een hoog ideaal: het verkrijgen van zelfstandige kennis aangaande de krachten van het leven, die overal rondom ons werkzaam zijn.

Dat mijn hoop niet verwezenlijkt zal worden kan en wil ik niet aannemen. Laat ons toonen, dat de geestkracht die aan Nederland aanzien heeft gegeven nog voortbestaat. Gij M. H. S. kunt dat door U met ernst aan de studiën te wijden, waarvoor U weldra de gelegenheid zal worden opengesteld. Het is aan U om het bewijs te leveren, dat de Nederlandsche Regeering door de stichting van het Bacteriologisch Laboratorium voldoet aan een edel verlangen: het verlangen om door waarneming en onderzoek de resultaten, welke een belangrijk onderdeel der Biologische wetenschap voor het praktische leven heeft afgeworpen, niet alleen te leeren kennen en doorgronden, maar, om ook het Uwe bij te dragen om aan die resultaten, zoodra Gij zelve in het raderwerk der samenleving zult gaan ingrijpen, nieuwe toe te voegen.

Over azijnethergist.

Handelingen van het vijfde Nederlandsch Natuur- en Geneeskundig Congres, gehouden te Amsterdam, 1895.

Inleiding[1]).

Meer of minder welriekende stoffen worden in vele gevallen door mikro-organismen voortgebracht. Sommige rottings-bacteriën vormen uit eiwitachtige lichamen, naast stinkende rottingsproducten, ook aangename aromatische stoffen. De hooibacteriën, op alkohol- en suikerhoudende vloeistoffen groeiende, brengen bij overvloedige toetreding van lucht, onder overigens nog niet goed bekende omstandigheden, zeer geurige producten voort. Zekere soorten van melkzuur-fermenten, bij voorbeeld de bacterie van de »lange wei« uit Noord-Holland, vormen het aangename aroma van room en versche boter. De chemische aard van de hierbij werkzame beginsels is niet bekend.

Daarentegen kan aangenomen worden, dat het karakteristieke aroma van azijn, voor zoover daarbij aan bacteriënwerking moet gedacht worden, hoofdzakelijk uit esters bestaat. In de azijn, welke door »wilde azijn-bacteriën« in den zoogenoemden »slijmvloed« van eiken wordt gevormd, ontstaat een mengsel van uiterst aangenaam riekende esters door de werking van het oïdium van *Endomyces Magnusii* en van *Saccharomyces apiculatus*, waarvan de eerste vermoedelijk appelether, de laatste zeker azijnether voortbrengt. Ook in het bouquet van wijn zijn zonder twijfel esters aanwezig, welke hun ontstaan aan de organismen van den most te danken hebben. Intusschen is de grens tusschen de door biologische en chemische invloeden gevormde stoffen in het bouquet van wijn en in dat van azijn tot heden nog niet scherp getrokken.

Duidelijke opgaven in de biologische literatuur omtrent ons onderwerp zijn schaarsch en alleen door Nägeli worden aan het ontstaan van azijnether in wijnmost door een gistsoort eenige theoretische beschouwingen vastgeknoopt. De overige schrijvers, welke over estervorming door mikro-organismen handelen, doen dit slechts ter loops. Door niemand, ook niet door Nägeli, zijn door mikroben voortgebrachte esters afgescheiden en chemisch onderzocht, steeds schijnt alleen de reuk tot maatstaf van beoordeeling te hebben gediend, zoodat het voor den scheikundige twijfelachtig kan schijnen of tot nu toe wel aan iemand de ontdekking van azijnether, of andere esters, als voortbrengsel van het mikrobenleven, kan worden toegekend. Daar het mij echter reeds in het jaar 1887 gelukt is azijnether in vrij groote hoeveel-

[1]) Dit onderzoek is, tusschen de jaren 1887 en 1895, uitgevoerd in het Bacteriologisch Laboratorium van de Nederlandsche Gist- en Spiritusfabriek te Delft.

heden in zuiveren toestand te verkrijgen als product eener bijzondere gisting, en de hierbij betrokken gistsoort zeer gemakkelijk ook door hare morphologische eigenschappen herkenbaar is, bestaat er voor mij niet de minste twijfel aan, dat bijv. de oudere opgaven van Nägeli en de onlangs door Lindner gepubliceerde, op dezelfde gistsoort al is het ook wellicht op andere variëteiten, betrekking, hebben, als die, waarmede ik mijne proeven heb gedaan. Het komt mij derhalve voor, dat in biologischen zin Nägeli als de ontdekker van de azijnethergist kan beschouwd worden, en, dat de door hem ingevoerde naam van *Saccharomyces sphaericus*[1]) voor onze soort voorloopig moet aangenomen worden, en verder, dat *Saccharomyces anomalus* Hansen[2]), waarbij Lindner[3]) en ook ik zelf azijnethervorming opmerkten, daarmede synoniem is.

Het is niet onbelangrijk te lezen, wat Nägeli aangaande onze gistsoort opmerkt, wijl daaruit blijkt, welke vreemde voorstellingen een zoo scherpzinnig en uitmuntend natuuronderzoeker zich van de gistingsprocessen kon maken, eer de nieuwere onderzoekingsmethoden op mikrobiologisch gebied waren ingevoerd. Hij komt n.l. op grond van de onjuiste meening, dat de azijnethervorming berust op de gelijktijdige werkzaamheid eener alkoholgist en van azijnbacteriën, tot de slotsom, dat gistingsprocessen niet in, maar buiten de cellen plaats hebben en tracht die meening ook door andere gronden te steunen. Dit is des te zonderlinger, daar Nägeli zeer juist heeft opgemerkt, »dass die Beschaffenheit der Hefe bei der Essigätherbildung von Wichtigkeit ist«, waaraan hij door het invoeren van den naam *S. sphaericus* uitdrukking geeft. De reden, waarom Nägeli in de genoemde fout is vervallen, moet daaraan worden toegeschreven, dat de azijnethergist gewoonlijk voorkomt in gezelschap van azijnbacteriën en dat het, zonder de toepassing der gelatine-methode, zeer moeilijk is om deze organismen van elkander te scheiden.

Voorkomen en verspreiding van de azijnethergist in de natuur.

De azijnethervorming, welke door Nägeli werd waargenomen, had voornamelijk plaats in most van roode Tiroler-druiven. Nägeli maakt de opmerking, dat hij met het sap van Italiaansche druiven en met kunstmatige voedingsoplossingen, waarin sporen biergist werden gebracht *meestal geen* azijnethervorming kon bereiken. Nägeli zag de azijnethervorming tot stand komen in kleine hoeveelheden most, welke in groote kolven snel geschud werden, of in vloeistoffen, waarop een kaamhuidje dreef, dat uit ronde of eenigszins langwerpige, maar niet uit cylindrische cellen bestond en dat hij een »azijnetherhuid« noemt. Ik neem in dit opstel het woord »azijnetherhuid« in tegenstelling van »kaamhuid« door *Saccharomyces Mycoderma* voortgebracht, over. Volgens Nägeli kan een dergelijke huid, mits daarin, behalve de gist, alleen bacteriën voorkomen, bijna al de aanwezige suiker in azijnether omzetten. Wanneer evenwel nog gisting in de vloeistof zelf plaats heeft, dan ontstaat ook alkohol.

---

[1]) Theorie der Gährung, pag. 21, 46 en 115, München 1879.

[2]) Compte-rendu des travaux du laboratoire de Carlsberg. Vol. 3, pag. 50, 1891.

[3]) Mikroskopische Betriebscontrolle in den Gährungsgewerben, pag. 216, 1895.

Door mijzelven werd de azijnethergist voor het eerst in 1886 onder de volgende omstandigheden aangetroffen. Bij gelegenheid van een bezoek aan een wijnberg te Dürkheim in den Rheinpfalz had ik eenige kilogrammen ruwe wijngist meegenomen. Deze wijngist bestond uit het bezinksel van den vergisten most, welk bezinksel bij het op vaten brengen van den wijn in groote kuilen geworpen en gedurende den winter afgestookt wordt. Een gedeelte van deze wijngist werd, bij mijne terugkomst te Delft, op filtreerpapier in het laboratorium gedroogd en in mortieren fijn gewreven. Ter zelfder tijd werden proeven genomen omtrent de melkzuurvorming in moutextract bij aanwezigheid van zinkzouten. Nu deed zich het geval voor, dat in een moutextractkolf, die door verdamping zeer geconcentreerd was geworden en omstreeks 1% zinksulfaat bevatte, een uiterst krachtige azijnethervorming werd waargenomen, welke, naar alle waarschijnlijkheid, door een, uit de ruwe wijngist afkomstige infectie met azijnethergist was ontstaan. Het gelukte mij, deze gist van de eveneens in het kolfje voorkomende kaam- en schimmelcellen te scheiden en jarenlang in cultuur te houden. Daar deze gistsoort, bij de eerste ontdekking uit langgerekte cellen bestond, meende ik daarin een geheel ander organsime den Nägeli's *S. sphaericus* te moeten zien en gaf daaraan, in voorloopige mededeelingen, den naam van *S. acetaethylicus*. Toen ik echter later met de polymorphie en met de groote variabiliteit der azijnethergisten bekend werd, en mijn eigen culturen nu en dan uit volkomen kogelronde cellen zag bestaan, ben ik tot de overtuiging gekomen, dat het organisme van Nägeli wellicht als variëteit, maar niet als soort van mijn azijnethergist verschilde, zoodat het invoeren van een nieuwen naam overbodig scheen. In de jaren 1887, 1888 en 1889 heeft de azijnethergist zich over verschillende lokaliteiten van de Nederl. Gistfabriek te Delft uitgebreid, zoodat elk luchtonderzoek de aanwezigheid daarvan aan het licht bracht. Maar in 1889 is door eene kleine verandering in de bedrijfsinrichting, de azijnethergist plotseling uit de gistfabriek zoo volkomen verdwenen, dat ik bij talrijke opzettelijke proeven nooit meer in de lucht der gistingslokalen azijnethergist heb kunnen vinden [1]). In de genoemde jaren waren de vurenhouten deksels der kuipen van melkzuurgistingen, aan de, aan vochtige uitwaseming blootgestelde binnenzijde met een dichte, uiterst vergankelijke schimmellaag bedekt, welke ik *Chalara polymorpha* zal noemen en *waaraan de azijnethergist als conidiën ontstond*. Deze conidiën zijn bij uitzaaiing constant gebleven en het is niet gelukt de *Chalara* op nieuw daaruit op te kweeken. De schimmel, welke ik hier *Chalara polymorpha* noem, was waarschinjnlijk uit de ruwe wijngist afkomstig en, bij de boven beschreven bewerking van uit het scheikundig laboratorium over de gistfabriek verspreid, en zal dus waarschijnlijk op nieuw uit ruwe wijngist te verkrijgen zijn.

In den loop der jaren vond ik azijnethergist, in verschillende variëteiten, op monsters maïs, rogge en gerst, welke uit Amerika, van de Zwarte Zee en van de Oostzee afkomstig waren en door mij, met inachtneming van vele voorzorgen, direct dit de schepen waren genomen. Daarmede overeenkomstige variëteiten werden op de mout der moutvloeren van de Nederlandsche Gist-en Spiritusfabriek te Delft gevonden. Bij al deze variëteiten was de azijnethervorming wel sterk, maar zwakker dan bij den van *Chalara polymorpha* afkomstigen vorm.

---

[1]) Wel daarentegen in de lucht der moutvloeren, waarin echter een andere variëteit van azijnethergist, welke van de gerst afkomstig is, wordt aangetroffen.

Zeer krachtige azijnethergisten vond ik op de oppervlakte van zuurdeeg, door mij uit eene boerderij te Beekbergen bij Apeldoorn verkregen, waarin zich bovendien melkzuurfermenten, en een kleincellige, zeer krachtige alkoholgist bevonden. De oppervlakte van dit zuurdeeg was met een dichte, sneeuwwitte conidiënlaag bedekt, welke afgesnoerd werden door een andere *Chalara-soort*, welke ik *Chalara vulgaris* wil noemen. *Chalara vulgaris* brengt, evenmin als de daartoe behoorende conidiën, azijnether voort, zoodat de op het zuurdeeg gevonden azijnethergist, niet van *Chalara vulgaris* afkomstig kon zijn. Ook heeft *Chalara vulgaris* niets vertoond van de merkwaardige, boven beschreven variabiliteit van *Chalara polymorpha*, het is steeds een volkomen constant conidiënafsnoerend mycelium gebleven.

In een ander monster zuurdeeg, door professor Snouck Hurgronje onder den naam van »Djeddahgist« uit Arabië medegebracht en mij welwillend door dr. van Romburgh afgestaan, werd eveneens hoogst actieve azijnethergist gevonden. Deze »Djeddahgist« bestond uit schijven hard gedroogd tarwedeeg van c. a. 5 cM. middellijn en 1½ cM. dikte, waarin persgist, melkzuurfermenten en kaamcellen de hoofdrol speelden. De daaruit geisoleerde azijnethergist-variëteit vormde in de eerste jaren meer azijnether dan alle andere door mij onderzochte variëteiten, maar dit verschil is in den laatsten tijd verloren gegaan, ofschoon kleine, karakteristieke morphologische kenmerken bewaard zijn gebleven. Dit verlies meen ik te moeten toeschrijven aan een met genoemde variëteit herhaaldelijk uitgevoerde koloniënselectie, waarbij waarschijnlijk nu en dan individuën zijn gekozen, welke minder azijnether maakten dan de overige koloniën.

Krachtige azijnethergisten heb ik verder geisoleerd van de oppervlakte van krenten van onbekenden oorsprong, en uit, in spontane gisting geraakt bessensap, dat uit het Westland afkomstig was.

Men ziet uit dit overzicht, dat onze gist eene groote geographische verspreiding heeft en waarschijnlijk overal voorkomt. Niettemin komt het mij voor, dat zij tot de vrij zeldzame soorten moet gerekend worden.

In den laatsten tijd is de azijnethergist ook door dr. Lindner, in het laboratorium der Brouwerijschool te Berlijn gevonden en wel, evenals door mij, in verschillende variëteiten. Enkele daarvan worden door den heer Lindner geidentificeerd (l. c. Noot 3 pag. 302) met *Saccharomyces anomalus* Hansen, omdat zij daarmede overeenkomen door de eigenaardige hoedvormige sporen. Ik kan mij bij deze meening aansluiten, daar de door mij van krenten geïsoleerde vorm volkomen overeenstemt, ook in de gedaante der sporen, met *S. anomalus*. Daar de azijnethergisten niet uit alle suikers even gemakkelijk azijnether voortbrengen, en, bij ondergedompelde levenswijze steeds, zelfs overigens onder de gunstigste omstandigheden, slechts een uiterst geringe hoeveelheid, is het zeer wel mogelijk, dat de heer Hansen, die de azijnethervorming bij *S. anomalus* niet vermeldt, toevallig onder omstandigheden heeft gewerkt, waarbij dit lichaam niet ontstaat. Hansen vond *S. anomalus* in biergist.

Lindner verdeelt zijn azijnethergisten in twee groepen, al naarmate daardoor wel of niet sporen worden voortgebracht. Ook bij mijne verschillende variëteiten heb ik ditzelfde verschil waargenomen [1]). Daar dit vermogen, hoe gewichtig het ook

[1]) Sporen zag ik bij de azijnethergisten afkomstig van krenten en uit bessensap, niet bij de variëteiten afkomstig van *Chalara polymorpha*, van mout, graan en zuurdeeg.

uit een physiologisch oogpunt moge zijn in hooge mate afhankelijk is van cultuurcondities, en gemakkelijk geheel en erfelijk verloren kan gaan, komt het mij weinig geschikt voor, om daarop soortverschillen te gronden, zoodat ik voorloopig de samenvatting van alle tot nu toe bekende vormen tot een enkele soort, *Saccharomyces sphaericus* Nägeli, wensch te handhaven.

Morphologische eigenschappen.

De morphologie der azijnethergist kan uit drieërlei oogpunt beschouwd worden, nl. ten eerste, met betrekking tot *de normale gedaante der cel en der sporen*, in verband met voedings- en ontwikkelingstoestand, in de tweede plaats, met betrekking tot *de polymorphie*, welke bij één der door mij gevonden variëteiten werd opgemerkt en in de derde plaats, met betrekking tot *de variabiliteit*, welke bij de meeste mijner variëteiten is waargenomen. Vooral de beide laatste verschijnselen zijn zeer merkwaardig en hoezeer ook bij eenige andere gistsoorten aan te treffen, bij de azijnethergisten door het groote verschil der vormen van bijzonder belang. Maar beschouwen wij elk dezer onderwerpen meer in het bijzonder.

Polymorphie. Boven werd op de zonderlinge waarnemingen gewezen, waartoe de azijnethergist, welke in de jaren 1887, 1888 en 1889 in de Nederlandsche Gistfabriek voorkwam en die waarschijnlijk uit ruw Dürkheimer wijngist afkomstig was, aanleiding heeft gegeven. Het bleek namelijk, dat tegen het houtwerk der melkzuurkuipen, niet de azijnethergist zelve, maar een fijn mycelium werd gevormd, aan welk mycelium ik den naam van *Chalara polymorpha* heb gegeven en waaraan de azijnethergist, in den vorm van kleine laterale conidiën, als bessen aan een tros, ontstond. Werd dit mycelium op gewone moutextract-gelatine van zwak-zure reactie overgebracht, dan plantte het zich aanvankelijk gelijkvormig voort onder overvloedige afscheiding van conidiën, die zich weer voordeden als zijdelingsche blaasjes aan de oudere myceliumcellen. Deze conidiën gaven, op de gelatine uitgezaaid, aanvankelijk ook de normale vorm van *Chalara polymorpha*, maar bij elke vernieuwde uitzaaiing werden de leden der myceliën korter en hun samenhang zwakker en in den loop van 10 à 14 dagen was er van de *Chalara* niets meer terug te vinden en bestonden de koloniën alleen uit gewone gistconidiën, die slechts enkele knoppen voortbrengen. Werden *Chalara*-cellen of de *Chalara*-conidiën na van het houtwerk te zijn afgenomen, direct in vloeibaar moutextract overgebracht, dan had de verandering in permanente azijnethergist-conidiën veel sneller plaats dan op de vaste voedingsbodems, zoodat het schijnt, dat de zuurstoftoetreding een onmiddellijken invloed op 't verschijnsel uitoefent. Deze metamorphose heb ik vele malen waargenomen tot in het jaar 1889 de *Charala* uit de gistfabriek is verdwenen. Alle pogingen om uit de conidiën weer tot de *Chalara* terug te keeren, zijn mislukt.

Chalara vulgaris, afkomstig van het Apeldoornsche zuurdeeg, is na jarenlange cultuur, gelijk boven reeds opgemerkt, geheel onveranderd gebleven en bestaat nog steeds in mijn verzameling uit een gesepteerd mycelium dat tallooze conidiën zijdelings afsnoert, welke conidiën, bij uitzaaiing, onveranderd *Chalara vulgaris* opleveren.

Normale morphologie. Gaan wij thans over tot de beschouwing van de hoofdpunten uit de morphologie der gistconidiën, zoodals die bij de proeven over de azijn-

ethervorming zich voordoen. De beste voedingsvloeistof om de azijnethergist tot snelle ontwikkeling te brengen, is moutextract van omstreeks 10 saccharometergraden. Bij matige temperaturen, welke het best niet hooger dan 25° C komen, ontstaat daarop vrij spoedig een gesloten, drijvende kaamhuid, die dunner blijft dan de gewone bier- of wijnkaamhuid en zich ook niet zoo sterk sluit. Dit verschil berust volstrekt niet op een zwakkere intensiteit van groei bij de azijnethergist, maar daarop dat de cellen der azijnethergist zwaarder zijn dan gewone kaamcellen en dus spoediger zinken; na eenigen tijd is dit bezinksel in moutextract veel grooter dan het bij de gewone kaamsoorten ooit worden kan, omdat de azijnethergist veel gemakkelijker maltose assimileert dan de bier- en wijnkaam. De celvorm, welke in de drijvende azijnetherhuidjes gewoonlijk wordt aangetroffen, is de kogelvorm; gedaanten, welke daarvan verschillen, kunnen echter onder bepaalde omstandigheden worden gevormd, hetzij in samenhang met het verschijnsel der polymorphie of in verband met den aard der onderzochte variëteit. De hierbij waargenomen vormverschillen kunnen zeer groot zijn; het optreden van cylindrische, zelfs draadvormige cellen, is niet uitgesloten. Nog veel beter dan in de kaamhuiden leert men deze verschillen kennen in de gelatineculturen. Vooral strepen of koloniën op de oppervlakte van moutextract-gelatine met of zonder glucose zijn voor dit onderzoek geschikt, omdat daarbij betrekkelijk dikke gistlagen ontstaan, welke op verschillende afstanden van de vrije oppervlakte, allerlei concentratiën van de van buiten toetredende zuurstof moeten bevatten, en daar ongetwijfeld juist de zuurstofconcentratie in hoofdzaak de gedaante der cellen bepaalt, is een enkel mikroskopisch beeld van zulk een gelatine-cultuur, vaak een ware staalkaart van de rijke morphologische differentieering, die de azijnethergist kan vertoonen.

Terwijl nu, gelijk gezegd, de op voedingsvloeistoffen drijvende azijnetherhuidjes meestal uitsluitend uit kogelvormige cellen bestaan, welke den naam van *Saccharomyces sphaericus* wettigen, komen in de gelatineculturen juist de langwerpige, langgerekte cylindrische of draadvormige cellen op den voorgrond. De gewone ellipsoidische gistcelvorm wordt in bijna alle zeer jeugdige culturen opgemerkt, en is, vergeleken met gewone bier- of wijngist, gekenmerkt door de kleinheid der cellen, welke omstreeks 5 μ meten, en het hyaline protoplasma, waarin eerst later de zoo eigenaardige vetdroppel optreedt, welke voor de zoogenoemde »*Torula*«-gisten (*Mycoderma spheromyces*) kenmerkend, is, en waarmede de azijnethergist ook in eenige andere opzichten, bijv. ten aanzien van hare verhouding tot de assimileerbare koolhydraten, overeenstemt.

De oppervlakte der op gelatine groeiende koloniën is meestal droog, meelachtig, sneeuwwit en als bestoven. Daarop komt echter eenne uitzondering voor, waarover ik beneden wensch te spreken in verband met de hier zeer eigenaardige verschijnselen van variabiliteit.

Sporenvorming. Bij sommige variëteiten van de azijnethergist, bijv. bij die, welke ik van krenten en uit bessennat isoleerde, worden in oude culturen, hoedvormige sporen aangetroffen, 2 tot 4 in elke cel. Zulke sporenvormende cellen komen geheel overeen met de door Hansen beschreven en afgebeelde (l. c. noot 2, pag. 302) *Saccharomyces anomalus*. De hoedvormige sporen worden ook bij vele echte, geen azijnether voortbrengende kaamgisten, welke ontwijfelbaar tot *Mycoderma* behooren, eveneens gevonden. Bij andere variëteiten onzer gist kan van sporenvorming niets

worden bemerkt, daarentegen werd bij deze asporogene varieteiten, somtijds een proces van *verjonging* gezien, dat is afstrooping van den celwand en vorming van een nieuwen wand om den daarbij vrijgekomen inhoud.

Ik wensch thans over te gaan tot het vermelden van eenige bijzonderheden aangaande de variabiliteit der azijnethergist. De daarbij waargenomen verschijnselen zijn belangrijk genoeg om er een bijzondere paragraaf aan te wijden.

Variabiliteit bij de azijnethergist.

Lang heb ik geaarzeld het thans te noemen verschijnsel met den naam van *variabiliteit* te bestempelen en niet met dien van *polymorphie*. Bij den aanvang van het onderzoek heb ik deze laatste uitdrukking gekozen, maar thans komt mij de aanleiding daartoe te zwak voor, en ik gevoel, dat de voornaamste reden, welke mij aanvankelijk tot die keus heeft doen besluiten, onhoudbaar is. Die reden was namelijk gelegen in de verrassend groote mate van standvastigheid in de verschillen tusschen de nieuwe vormen, welke hier in aanmerking komen, en die bij azijnethergist, afkomstig van Oostersche krenten, van Geldersch en Arabisch zuurdeeg en uit Westlandsche bessensap, telkens op dezelfde wijze terugkeeren en de overtuiging vestigen, dat, welke ook de naaste prikkels zijn, die tot het ontstaan der varieteits- of soortverschillen aanleiding geven, inwendige oorzaken het verschijnsel in hoofdzaak beheerschen. Het schijnt mij tegenwoordig echter toe, dat het juister is deze opmerkelijke constantie in den aard der variabiliteit tot het begrip van de *analoge variatie* te brengen, dan tot dat der polymorphie.

Bij de hoogere organismen komen vele soorten voor, welke in hun morphologie overeenkomst vertoonen met het hier te beschouwen geval. Zoo bijv. het ontstaan van de nectarinen uit de gewone perzik (Darwin, Domestication. 2e Ed, vol. 1, pag. 357), dat van het ontstaan van *Pavo nigripennis* uit *Pavo cristatus* (Darwin, Domestication 2e Ed. vol. 1, pag. 305) etc. Kwamen deze »variatiën« iets algemeener voor, dan zij dit werkelijk doen, dan zou wellicht niemand aarzelen daarbij van »polymorphie« te spreken, terwijl hare zeldzaamheid thans iedereen aanleiding geeft daarin »variabiliteit« te zien. Omgekeerd heb ik den indruk gekregen, dat, zonder de klassieke onderzoekingen van Darwin en Hildebrand over de trimorphe heterostylie, de kortstijlige vorm van *Lythrum Salicaria* als een niet zeldzaam voorkomende variëteit dezer soort en niet als een voorbeeld van polymorphie zou worden aangezien, terwijl dit laatste ongetwijfeld ten opzichte van de lang- en middenstijlige vormen zou worden gedaan, ten minste in de omstreken van Wageningen, waar de beide laatste veel algemeener voorkomen en veel meer op elkander gelijken dan op de in allerlei opzichten afwijkend gebouwde en veel zeldzamere kortstijlige vorm.

Ofschoon ik deze aangelegenheid als van groot biologisch belang beschouw en in de juiste omschrijving en afbakening van wat onder »polymorphie« en van wat onder »variabiliteit« moet verstaan worden, een vraag zie, die vele toekomstige pennen in beweging zal brengen, moet ik hier van dit onderwerp in het algemeen afstappen en tot de behandeling van ons concreet voorbeeld overgaan.

De azijnethergist dan, kan onder twee hoofdvormen gecultiveerd worden, die morphologisch in hooge mate, physiologisch wel is waar minder, maar toch ook zeer belangrijk van elkander verschillen. Boven werd onder de »*Normale morphologie*«

alleen met de hoofdvorm rekening gehouden, die zeer veel algemeener is dan de bijvorm (of de bijvormen). Ieder die ondervinding heeft van de groep der Saccharomyceten zal den hoofdvorm zonder aarzelen brengen tot de »Kaamgisten«, den bijvorm daarentegen tot de »Echte gistsoorten«, en derhalve daartusschen een verschil maken, dat systematisch aan het verschil tusschen twee ondergeslachten beantwoordt en in de nieuwere gistingphysiologie, waarin de kaamgisten tot een afzonderlijk geslacht, *Mycoderma*, worden gebracht, zelfs tot het rangverschil tusschen twee geslachten zou voeren.

Mikroskopisch is de »bijvorm« van de azijnethergist gekarakteriseerd door de gelijksoortigheid der cellen, die in zeer jeugdige culturen eenigszins langwerpig, overigens bijna volkomen rond zijn en in zoover weder goed beantwoorden aan den naam van *S. sphaericus*. In de oudere cellen wordt de bovengenoemde vetdroppel bijna steeds aangetroffen, waardoor de gelijkenis op *Mycoderma spheromyces* groot wordt. In de gelatine-culturen zijn de cellen van den »bijvorm« steeds kleiner dan van den hoofdvorm; vele volwassen cellen blijven zelfs zoo klein, dat zij de groote van mikrokokken nauwelijks overtreffen en dan geen duidelijke tegenstelling tusschen wand en inhoud vertoonen.

Maar nog veel belanggrijker zijn de *makroskopische* verschillen tusschen de twee vormen, vooral in de gelatine-culturen. Terwijl n.l. de hoofdvorm zich daarbij voordoet, als sneeuwwitte, droge, als 't ware bestoven of meelige massa, die betrekkelijk spoedig tot vervloeiing van de cultuurgelatine (vooral indien biergelatine als voedingsbodem wordt toegepast) aanleiding geeft, is de bijvorm glad, grijsachtig, vochtig, zoodat de bovengenoemde tegenstelling tusschen »kaamvorm« en »gistvorm« daarbij zeer duidelijk in 't oog valt, en van versmelting van den cultuurgrond is daarbij of niets of eerst zeer laat een begin waar te nemen. Het is juist dit groote verschil in het uiterlijk der koloniën, waardoor het mogelijk is de mate van variabiliteit in de koloniën-culturen op de gelatineplaten te beoordeelen. Het vinden van den bijvorm vereischt echter oplettendheid, daar onder eenige honderde of zelfs duizende normale cellen slechts enkele afwijkende voorkomen. Onder hoogere en grootere plantensoorten, welke veel ruimte beslaan, kan een enkel eenigszins afwijkend individu, dat onder een duizendtal normale voorkomt, licht over het hoofd worden gezien. Bij de mikroben-culturen is het daarentegen gemakkelijk groote aantallen van koloniën snel en zeker af te monsteren. Hiertoe is het echter een bepaald vereischte, dat de koloniën alle op volkomen gelijke wijze en dus niet in, maar alleen op de gelatine geplaatst zijn, want het is duidelijk dat het eigenaardige wit bestoven karakter van den hoofdvorm bij insluiting in voedingsgelatine geheel verloren gaat.

Daar de eigenschappen van hoofd- en bijvorm erfelijk zijn, levert een uitzaaisel van den bijvorm, bijvorm-koloniën op, waaronder slechts zeer weinig afwijkende, dat is eenigszins, maar niet volkomen op den hoofdvorm gelijkende koloniën voorkomen.

Herhaalt men nu de proef met de normale bijvorm-koloniën dezer 2e generatie, zoo blijkt onder overigens identieke omstandigheden het getal afwijkende koloniën daarbij verkregen, nog geringer te zijn dan bij de eerste uitzaaiing, dat wil zeggen, de mate van neiging tot terugslag is verminderd. Bij voortzetting dezer proefneming wordt de bijvorm meer en meer constant en weldra is niets afwijkends meer in de culturen te vinden. In sommige gevallen was van af de eerste uitzaaiing van bijvorm-

koloniën onder duizendtallen alles gefixeerd, zoodat men, voor de eerste maal deze feiten waarnemende, aanvankelijk meent, dat de bijvorm slechts een toevallig uit de lucht afkomstige vreemde gistsoort is, welke als verontreiniging in de culturen van den hoofdvorm is beland. Maar spoedig overtuigt men zich door de krachtige azijnethervorming bij den bijvorm, dat hier een variatieverschijnsel bestaat.

Gaat door eene of andere oorzaak de bijvorm verloren, dan kan men daartoe steeds weer gemakkelijk terugkeeren, door het uitzaaien van oud geworden, dat wil zeggen langdurig bewaarde gelatineculturen van den hoofdvorm, die dan steeds een klein getal bijvorm-koloniën oplevert. Jonge, dat is spoedig overgeënte hoofdvorm-culturen, zijn echter zeer constant en leveren volstrekt geen bijvorm-koloniën. Daar in oude gelatine-culturen, de gelatine steeds vervloeid is, kon men verwachten, dat oude culturen in voedingsvloeistoffen zich juist zoo zouden verhouden als die op gelatine. Dit is echter niet geheel het geval, de laatste zijn beter geschikt om de bijvormen te verkrijgen dan de eerste. Ik schrijf dat verschil echter alleen aan een bijomstandigheid toe, n.l. aan de luchttoetreding, die bij de gelatine-culturen rijkelijker moet zijn dan in de vloeistoffen en ik heb neiging, hoezeer het bewijs nog niet volledig kon gebracht worden, in de zuurstoftoetreding, den eigenlijken aanstoot tot de vairiabiliteit te zien, welke tot het ontstaan van den bijvorm voert. Ik voel mij daartoe gedrongen, omdat ook hier, evenals in enkele andere nauwkeuriger bekende gevallen van variabiliteit, temperaturrsverhooging het optreden der variatie op overeenkomstige wijze begunstigt als het oud worden der culturen. Zeer krachtige oxydatieverschijnselen, welke wellicht een gedeelte van de levende stof der varieerende cel blijvend vernietigen, liggen misschien aan het verschijnsel ten grondslag.

De afwijkende koloniën, welke in omvangrijke culturen van den bijvorm kunnen worden aangetroffen, zijn, zooals boven reeds is opgemerkt, niet aan den hoofdvorm gelijk.

Een volledige terugkeer van uit den bijvorm tot den hoofdvorm is mij tot nu toe niet voorgekomen. Wel is een gedeeltelijke terugkeer daarbij, onmiskenbaar. Er ontstaat namelijk nu en dan uit den bijvorm een witachtige, meelig bestoven koloniënvorm, die uiterlijk wel op den hoofdvorm gelijkt en ook vrij gemakkelijk een »azijnetherhuid« op cultuur-vloeistoffen voortbrengt, maar mikroskopisch aan den bijvorm gelijk is gebleven. Juist aan het betrekkelijk algemeene voorkomen van dezen tusschenvorm schrijf ik het toe, dat ik tot nu toe geen volledigen terugslag van bijvorm tot hoofdvorm heb waargenomen. Want wanneer dit verschijnsel even zeldzaam is als het omgekeerde, dat is als het ontstaan van bijvorm uit hoofdvorm, dan moet het moeielijk zjin onder de tusschenvormkoloniën, die veel algemeener zijn, den daarvan moeielijk onderscheidbaren hoofdvorm te herkennen. Ik hecht dus aan dit hiaat in de waarnemingen niet veel gewicht.

Eer ik met deze beschouwing over de variabiliteit der azijnethergist eindig, moet ik opmerken, dat er ook nog andere tusschentrappen tusschen hoofd- en bijvorm bestaan dan de zooeven genoemde welke direct uit den hoofdvorm ontspringen en onder dezelfde omstandigheden als, maar iets minder vaak dan de bijvorm. Onder deze tusschenvormen is er vooral een tamelijk karakteristieke middenvorm, die betrekkelijk dikwijls ontstaat, terwijl de vormen, die meer naderen hetzij tot hoofdvorm of tot bijvorm, veel zeldzamer zijn.

In den aanvang dezer paragraaf wees ik op de schijnbare overeenstemming met

de polymorphie, welke de verschijnselen van de veranderlijkheid der azijnethergist ontegenzeggelijk vertoonen en op het gewicht van het scherp begrenzen dezer begrippen. Ik wil er thans nog op wijzen, dat in de variabiliteit der azijnethergist, die zich op analoge wijze bij een aantal andere gistsoorten herhaalt, in geen geval een eigenschap kan gezien worden, die op een lijn moet gesteld worden met de »pleomorphie« der hoogere Fungi, waarmede juist het beschreven geval van polymorphie der azijnethergist analoog schijnt te zijn, daarmede ten minste in bijna alle essentieele opzichten overeenstemt. Ook is het reeds op zich zelve in zekeren zin tegenstrijdig aan te nemen, dat polymorphie, welke zoo bij uitnemendheid een soortkenmerk is, ook in conidiën-generaties zou worden gezien.

Wat betreft de voedingsvoorwaarden, waarbij de variëteitskenmerken het beste zichtbaar worden, moet nog worden opgemerkt, dat daartoe zwak zure moutextractgelatine het meest geschikt is. Zeer fraai komen de onderscheidingskenmerken ook op biergelatine voor den dag, terwijl geheel kunstmatige voedselmengsels daarvoor veel minder zijn aan te bevelen, niet omdat daarop de variabiliteit uitblijft, maar omdat het verschil tusschen de koloniën bij zwakke vergrooting zoo moeielijk waarneembaar wordt en aan een direct mikroskopisch onderzoek van duizende koloniën natuurlijk niet te denken valt.

Naast het hier behandelde geval van morphologische variabiliteit, heb ik bij de uit *Chalara polymorpha* verkregen conidiën, »physiologische variabiliteit« waargenomen, bestaande in eene belangrijke vermindering van het vermogen om azijnether voort te brengen, bij overigens in ieder ander opzicht onveranderd gebleven kenmerken. Ook met de azijnethergist uit Djeddahgist afkomstig, is de volledige physiologische verbranding meer en meer op den voorgrond, de azijnethervorming op den achtergrond getreden. Daar ik juist deze twee variëteiten het langste in cultuur heb en daarmede vele proeven heb genomen, kan ik niet uitmaken of hier moet gedacht worden aan eene verkeerde koloniënselectie of aan rasdegeneratie, — ik vermoed het laatste.

Voeding, alkoholgisting, zuurvorming, azijnethervorming en physiologische verbranding.

Voor de soortkarakteristiek in de familie der Saccharomyceten levert de verhouding der gistsoorten tegenover verschillende suikers kenmerken van groote waarde op. Daardoor laten zich een zeker getal *physiologische typen* opstellen, die door den graad der specialiseering, dat wil zeggen door het grootere of kleinere aantal suikersoorten en verwante stoffen, welke daardoor kunnen geassimileerd worden, onderscheiden zijn en waarop met zeker recht namen als *Glukomyces, Raffinomyces, Lactomyces, Polysaccharomyces* kunnen toegepast worden. Terwijl wij reeds vroeger zagen, dat de azijnethergist, wat de hoofdvorm aangaat, uit een morphologisch oogpunt wellicht tot de kaamgisten moet gebracht worden, d. i. tot het ondergeslacht *Mycoderma*, terwijl de bijvorm dan tot de gewone gistsoorten zou behooren, is zij uit een physiologisch oogpunt, zoowel in den toestand van hoofdvorm als bijvorm, een *Polysaccharomyces*. Dit volgt uit het feit, dat de meest verschillende koolhydraten tot haar voeding en groei kunnen dienen. Glukose, levulose, rietsuiker, maltose, dextrine, raffinose, mannit, glycerine worden gemakkelijk geassimileerd.

Ook alkohol en acetaten worden, hoezeer veel moeielijker en alleen in gelatineculturen, opgenomen en geven tot groei aanleiding. Azijnether is daarentegen niet assimileerbar en moet als een eindproduct van de stofwisseling worden beschouwd. Uit dit overzicht volgt aan den eenen kant de physiologische gelijkenis op de gewone wijn- en bierkaam, n.l. door de assimileerbaarheid van glycerine, alkohol en acetaten, an den anderen kant de verwantschap tot de overige gistgroepen, welke maltose en rietsuiker assimileeren, wat de kaamgisten onder gewone omstandigheden niet doen. Het eigenaardige dubbele morphologische karakter komt dus ook in de physiologische eigenschappen te voorschijn.

Zullen de genoemde koolstofverbindingen geassimileerd worden, dan moeten, behalve de noodige phosphaten en aschbestanddeelen, ook geschikte stikstofbronnen aangeboden worden. Daar het stikstofgehalte van de azijnethergist echter zeer gering is, kan er met zeer kleine hoeveelheden dezer verbindingen reeds veel gist gevormd worden. Het is mij gebleken, dat in de stikstofbehoefte door de meest verschillende stikstofbronnen kan voorzien worden, hoezeer in verschillenden graad van gemakkelijkheid. De volgende stoffen onderzocht ik bij overigens gelijke omstandigheden: asparagine, chloor-ammonium, ammonium-sulfaat, pepton, glykokol, ureum en kaliumnitraat en bevond, dat de daarmede in gelijken tijd voortgebrachte hoeveelheden azijnethergist het grootst waren voor asparagine, het geringst voor kalisalpeter, en dat de overige stoffen, in de gegeven volgorde, een afdalende reeks vormden. Tusschen de gemakkelijkheid, waarmede het phosphorzuur wordt opgenomen, kon ik geen verschil bemerken, wanneer natrium-, kalium-, ammoniumphosphaat of phosphorzout werd aangeboden, indien slechts zorg werd gedragen, dat de zuurtiter der gebruikte voedingsoplossingen dezelfde was. Ook aan pyrophosphaten en phosphorigzure zouten kon de noodzakelijke phosphor onttrokken worden, maar hierbij werden alleen proeven met kaliumverbindingen uitgevoerd.

De azijnethergist behoort tot de alkoholgisten, maar dit karakter komt slechts onder bepaalde omstandigheden te voorschijn, omstandigheden die dezelfde zijn als bij de gewone *Mycoderma*vormen. Het is daartoe n.l. noodig, dat de gist ondergedompeld leeft en dat glukose of levulose in de behoefte aan koolhydraten voorzien. Andere suikersoorten zijn daartoe niet geschikt, bijv. maltose en dextrine, terwijl rietsuiker vooraf geinverteerd wordt. Daar de inversie van rietsuiker door azijnethergist langzaam en moeielijk geschiedt, is ook de alkoholgisting daaruit minder krachtig dan uit glukose en levulose. De eenvoudigste wijze om suikersoorten op hun vermogen van alkoholvorming te onderzoeken, bestaat in het toevoegen ervan, in concentratien van 2 à 15%, aan gistaftreksel.

De gevormde alkohol is onder alle omstandigheden aethyl-alkohol. In de ruwe distillaten zijn daarmede echter steeds een weinig azijnether en wellicht ook sporen van hoogere esters gemengd, waardoor het product een sterk bouquet vertoont.

Ontstaat bij de alkoholgisting door azijnethergist slechts een zeer geringe hoeveelheid azijnether, geheel anders wordt dit, wanneer door zeer rijkelijke zuurstoftoetreding de alkoholgisting is uitgesloten, bijv. wanneer de cultuur zich als drijvenden azijnetherhuid op de voedingsvloeistof bevindt of als gistlaag tegen de oppervlakte van een vast substraat groeit. Zal echter onder deze omstandigheden *de azijnethervorming zoo sterk mogelijk zijn,* dan moeten de drijvende huidjes niet uit een enkele, maar uit meerdere cellagen bestaan. Een nauwkeurig onderzoek leert, dat

dit feit daardoor verklaard moet worden, dat de azijnethergist behalve alkohol en azijnether nog bovendien azijnzuur, een suikerzuur, koolzuur en water uit een deel van de verdwenen suiker voortbrengen kan, en dat de mate van zuurstoftoetreding aan het tot stand komen van het eene of het andere dezer processen ten grondslag ligt.

De vorming van koolzuur en water heeft bij de azijnethergist zonder twijfel onder alle omstandigheden plaats, maar toch naar het schijnt alleen dan het meest intensief, wanneer de andere genoemde processen zijn uitgesloten. Daar deze volledige en meest zuivere vorm van de physiologische verbranding zeer begunstigd wordt door de temperatuur en daarmede sneller stijgt dan de azijnetherproductie, hoezeer deze ook in hooge mate door de warmte wordt verhoogd, is het, voor het maken van veel azijnether wenschelijk bij een niet hoogere temperatuur dan 25° C te cultiveeren.

Van de verschillende assimileerbare koolstofbronnen, *geven* slechts enkele *aanleiding tot azijnethervorming* n.l. *glukose, levulose* en *rietsuiker* in groote hoeveelheid, maltose veel minder en dextrine slechts in sporen. Om deze reden is bier, waarop de azijnethergist overigens goed groeit en gemakkelijk een drijvende huid vormt, ongeschikt voor de azijnetherbereiding. Moutextract zonder verdere toevoegingen, waarin het gehalte aan rietsuiker en glukose zeer gering is, is eveneens voor azijnethervorming weinig geschikt, maar wordt daaraan glukose of rietsuiker toegevoegd, dan kan een daarop drijvende azijnetherhuid krachtig werken. Intusschen moet het gehalte aan deze suikers in het moutextract niet te hoog worden opgedreven. Gaat men bijv. boven 5% glukose, dan wordt het moeielijk huidvorming te bewerken, de cellen zinken onder en geven tot sterke alkoholgisting van de glukose aanleiding. Door temperatuurverlaging kan dit onderzinken echter tegengegaan worden en het is mij zelfs gelukt op moutaftreksels met 10% glukose huidvorming te verkrijgen door in een koud vertrek te cultiveeren. Maar daarbij was en bleef de azijnethervorming betrekkelijk gering. Men bezige derhalve 3 à 4% glukose.

Zeer eigenaardig is de invloed van den bindingsvorm, waarin de stikstof wordt aangeboden op de azijnethervorming. In vier kolven, gevuld met kunstmatige voedingsvloeistoffen van de volgende samenstelling:

89,5	G.	water
10,0	G.	glukose
0,2	G.	kaliumphosphaat
0,2	G.	magnesiumsulfaat
0,1	G.	chloorcalcium

werden achtereenvolgens gebracht, in de eerste kolf, 0,5 gram pepton siccum, in de 2e, 0,5 gr. asparagine, in de 3e, 0,2 gr. chloorammonium, in de 4e, 0,2 gr. kalisalpeter. Daarna werd met een platinaoogje op elk een even groot stukje eener drijvende azijnetherhuid gebracht. Na plaatsing in een thermostaat bij 24° C bleek na verloop van vier dagen, dat de volgende toestand was ingetreden. In de peptonkolf was matig veel gist gevormd, die geheel was gezonken, zonder azijnether te vormen. In de 3 overige kolven was, behalve bezonken gist een gesloten drijvende huid ontstaan, die het krachtigst was in de asparaginekolf, het zwakste in de salpeterkolf. In alle 3 was azijnether ontstaan, het minste in de salpeterkolf, waarin het huidje na nog vier dagen onderzonk, terwijl het in de beide andere bleef drijven.

Hierna werden de peptonkolf en de salpeterkolf in een koud vertrek geplaatst. Na omstreeks een week, ontstond onder invloed van de lage temperatuur een drijvend huidje in de peptonkolf, maar de azijnethervorming bleef wel niet geheel uit, maar toch uiterst zwak. In de salpeterkolf veranderde de toestand niet meer. Aan het eind der proef werd in de asparagin- en chloor-ammoniumkolven geen suiker teruggevonden, in de peptonkolf omstseeks 5%, dus de helft van de oorspronkelijke hoeveelheid, in de salpeterkolf 6%.

Voor de bereiding van azijnether in grootere hoeveelheden heb ik na talrijke proeven rozijnen, krenten en dadels, die alle rijk zijn aan vruchtsuiker, als de beste materialen leeren kennen [1]). Deze materialen worden met ongeveer hun volume aan water opgeweekt, in een mortier fijn gewreven en de zoo verkregen pap in dunne lagen in Erlenmeijersche kolven opgekookt. Na afkoeling heeft het infecteeren plaats met een voorafgaande azijnethergisting, liefst in grootere hoeveelheid, daar het infectiemateriaal zoo spoedig mogelijk op de halfvloeibare massa een gesloten azijnetherhuid vormen moet.

Daar de azijnether voor de meeste vreemde organismen sterk antiseptisch werkt, behoeft men niet te vreezen, dat deze proeven, ook bij eenigszins gebrekkige voorzorgen, licht zullen mislukken. Alleen gewone gistsoorten, kaamgist en azijnbacteriën moeten zorgvuldig verwijderd worden gehouden, wat in een laboratorium zeer gemakkelijk is en bij een fabriekmatig bedrijf uitvoerbaar schijnt.

De azijnether is echter ook schadelijk voor de levensfunctiën der azijnethergist zelve, welke, reeds bij een gehalte in rozijnenpap van 0,2% azijnether, ophoudt nog meer van deze stof voort te brengen, terwijl nog onveranderde suiker in overvloed voorhanden is. Wordt daarvan echter de azijnether afgedistilleerd, en de achterblijvende massa met de noodige voorzorgen opnieuw geïnfecteerd met azijnethergist, dan begint de azijnethervorming met vernieuwde kracht. Door toevoeging van asparagine en ammoniumphosphaat of zelfs chloor-ammonium als stikstofbron kon in deze aftreksels het proces nog worden versneld en mijne proeven doen mij verwachten, dat het mogelijk zal zijn, op deze discontinue wijze de suiker uit rozijnen volledig door azijnethergist om te zetten. Welk constant verlies van suiker hierbij aan de volledige verbranding tot koolzuur en water te wachten is, kan ik nog niet mededeelen, evenmin bij welke suikerconcentratie het voordeeligst volgens dit systeem te werken zal zijn.

Een denkbeeld van de rendementen aan azijnether, welke ik bij mijne proeven bereikt heb, verkrijgt men uit de volgende gegevens. Rozijnenpap met een oorspronkelijk suikergehalte van 15% leverde, bij tweevoudige infectie volgens bovengenoemde handelwijze 0,4% azijnether berekend op de oorspronkelijk aanwezige suiker. Daar 10% suiker hierbij onaangeroerd waren gebleven, was blijkbaar 0,8% van de verdwenen suiker in azijnether veranderd, een getal dat mijne verwachting heeft overtroffen en vermoedelijk nog belangrijk zal kunnen worden opgedreven [2]).

Wenschte men uit *graan* azijnether te maken, dan zou na versuikering door mout, omzetting der maltose in glukose, aan de azijnethervorming moeten vooraf-

---

[1]) In de door mij gebruikte rozijnen zat 52% suiker en c. a 13% water

[2]) Nägeli's opgaaf, dat in most *al* de suiker in azijnether kan veranderen, wordt door hem zonder eenige nadere toelichting gedaan

gaan. Industrieel zou dit het beste te bereiken zijn door middel van de glukase, dat is het enzym, dat in het meel van ongekiemde maïs voorkomt.

De azijnether uit rozijnen verkregen wisselt eenigszins in kookpunt, wellicht afhankelijk van de gebruikte gistvariëteiten, die dan verschillende bijmengsels zouden voortbrengen. Zoo verkreeg ik, in 1887, met de conidiën van *Chalara polymorpha* een azijnether van 71 à 72° C kookpunt, in 1895 met de azijnethergist uit bessensap een azijnether van 73½ à 75° C kookpunt. Deze laatste waarneming heb ik te danken aan den heer A. van Delden, technoloog, werkzaam in het chemisch laboratorium der Polytechnische school, die mijne latere ruwculturen heeft afgedistilleerd.

De heer van Delden heeft zich verder door een elementairanalyse overtuigd, dat de verkregen stof ongetwijfeld azijnether is. Hij vond namelijk:

	Koolstof.	Waterstof.
Azijnether door azijnethergist gevormd	54,45% . . .	9,3%
Berekend voor aethylacetaat	54,54% . . .	9,1%

Professor van 't Hoff en Dr. van Deventer stelden in 1887 vast [1]) dat mijn azijnether, welke hen als product van het leven interesseerde, in overeenstemming met de verwachting, geen draaiend vermogen voor het gepolariseerde licht bezit.

De *zuurvorming* is bij de azijnethergist eene zeer veranderlijke functie. De krachtigste uiting daarvan nam ik waar bij cultuur op vasten bodem met dik-opliggende, niet al te talrijke koloniën op eene dunne laag cultuur-gelatine. Zoowel glukose als rietsuiker, hetzij ingesloten in moutextract gelatine of in geheel kunstmatige voedingsgelatine met chloorammonium als stikstofbron, geven tot zeer belangrijke zuurvorming aanleiding. Na het smelten van deze cultuurgelatinen, nadat de azijnethergist daarop omstreeks 14 dagen gegroeid had, titreerde ik per 100 c.M^3 gelatine, 15 c.M^3 normaal zuur. Na afdistilleeren dezer gelatine tot het distillaat neutraal reageerde, werd in het distillaat omstreeks de helft van het gevonden zuur als azijnzuur teruggevonden. Het achtergebleven, niet vluchtige zuur is waarschijnlijk een direct oxydatieproduct van suiker, vergelijkbaar of identiek met het glukonzuur, dat azijnbacteriën uit glukose voortbrengen.

De eenvoudigste wijze om de zuurvorming door azijnethergist quantitatief zichtbaar te maken is het gebruik van een met een bekende hoeveelheid krijt vermengden cultuurbodem. Trekt men daarop strepen van de verschillende variëteiten van azijnethergist, dan ontstaan, voor zoover vrije zuren zich door diffusie in de gelatine verspreiden, heldere doorschijnende velden in den witten grond. De kalkzouten der hierbij gevormde zuren worden, door de azijnethergist zelve weder langzaam geassimileerd onder afscheiding van calciumcarbonaat als eindproduct.

---

[1]) Van 't Hoff. Dix années dans l'histoire d'une théorie, pag. 40, Rotterdam 1887.

Ueber eine Eigentümlichkeit der löslichen Stärke.

Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde, Jena, II. Abteilung, II. Band, 1896, S. 697—699.

Die Diskussionen, welche in der letzten Zeit wieder über den Aufbau des Stärkekornes eröffnet sind, veranlassen mich, folgende Beobachtung mitzuteilen, welche vielleicht geeignet ist, neue Versuche über die Natur der kolloidalen Körper anzubahnen.

Bei meinen zahlreichen Diffusionsversuchen mit amylasehaltigen Präparaten auf festem Substrate habe ich meistens anstatt gewöhnlicher Stärke lösliche Stärke verwendet. Dieser Körper entsteht [1]) durch Uebergiessung von Kartoffelstärke mit Salzsäure von 7,5-proz. Einwirkung bei Zimmertemperatur während 2 Tagen und durch zweimalige Erneuerung der Säure und Wiederholung der Einwirkung. Es wird dann mit destilliertem Wasser ausgewaschen und zuletzt mit verdünntem Natriumkarbonat, wobei ein Körper resultiert, welcher mikroskopisch die Struktur und alle übrigen Eigenschaften des Stärkekornes beibehalten hat, sich jedoch in kochendem Wasser vollständig klar und in jedem Verhältnisse löst. Beim Erkalten der Lösung scheidet sich die Stärke jedoch in amorphem Zustande ab, und Lösungen von 8 Proz. und mehr erstarren beim Erkalten zu einer alabasterweissen Gallerte. Bei meinen obengenannten Versuchen musste ich nun fortwährend rechnen mit der folgenden bemerkenswerten Eigenschaft der löslichen Stärke: *Ihre wässerige Lösung lässt sich nicht mischen mit einer wässerigen Gelatinelösung, selbst nicht bei Kochhitze. Beim Schütteln beider entsteht deshalb eine Emulsion.*

Versucht man also z. B. in einer 20-proz. Lösung löslicher Stärke durch Kochen 5-proz. Gelatine zu lösen, so wird man mit der Lupe oder bei schwacher Vergrösserung eines Tropfens der Mischung unter dem Mikroskope bemerken, dass man nur eine Emulsion erhalten hat, und zwar eine Emulsion von Gelatinetröpfchen in Stärkelösung. Lässt man sie erstarren, so entsteht eine Stärkeplatte, welche die erstarrten Gelatinetropfen in Suspension erhält. In den Gelatinetröpfchen finden sich ihrerseits eine grosse Menge äusserst fein verteilter Stärketröpfchen, welche nur bei stärkerer Vergrösserung und durch Jod-Einwirkung sichtbar werden.

Erhöht man den Gelatinegehalt der Stärkelösung, so entsteht allmählich eine Lösung, welche so viel Gelatinetröpfchen enthält, dass diese einander beim Erstarren beinahe berühren und abplatten können, und mit einiger Vorsicht lässt sich daraus auf der Objektplatte ein »künstliches Zellgewebe« darstellen, wovon die Zwischenwände

[1]) Journal für praktische Chemie. Bd. XXXVI. 1886. p. 378.

aus Stärke, der »Zellinhalt« aus Gelatine besteht. Wird der Gelatinegehalt dann noch weiter vermehrt, so kehrt sich die Sache um, die Stärke scheidet sich als Tropfen ab, welche in der Gelatinemasse suspendiert sind. Beim Abkühlen erstarren diese Stärketröpfchen natürlich, doch zeigen sie dann, wie zu erwarten war, im polarisierten Lichte keine Doppelbrechung, so dass sie auf die Struktur der natürlichen Stärke kein neues Licht werfen. Fügt man der Gelatine Kochsalz zu, so löst sich darin etwas Stärke, was durch die Jodreaktion sichtbar wird. Steigende Gehalte an Glycerin wirken störend; 20 und mehr Proz. dieses Körpers zugesetzt, erzeugen eine anscheinend vollständige Mischung und heben zugleich das Erstarrungsvermögen auf. Lässt man durch Berührung mit Wasser das Glycerin hinausdiffundieren, so entsteht ein homogenes Gemisch, welches sich nach neuer Erhitzung wieder trennt.

Die Grösse der Tröpfchen kann man willkürlich abändern, einfach durch starkes Schütteln der heissen Lösung. Da die Stärkelösung spezifisch schwerer ist wie die Gelatinelösung, wird man bei ruhigem Stehen des Gemisches eine Trennung beider Bestandteile bemerken, wobei die Stärkelösung immer untersinkt, ähnlich wie eine Emulsion von Oel in Wasser sich trennen würde.

Mit Gelatine und Agar, Gelatine und Inulin, Gelatine und arabischem Gummi, Gelatine und Dextrin, Agar und löslicher Stärke, Agar und Inulin, Agar und arabischem Gummi, Agar und Dextrin habe ich die gleichen Erscheinungen nicht wahrnehmen können, ich muss deshalb annehmen, dass es sich um eine spezifische Eigenschaft der Stärke in Bezug auf Gelatine handelt. Besonders bemerkenswert scheinen mir die weiten Schwankungen, welche im Wassergehalt der beiden Lösungen vorkommen können, ohne dass dadurch der Hauptcharakter des Versuches geändert wird.

Die vielen Fragen, zu welchen dieses sonderbare Gemisch zweier Kolloiden veranlasst, besonders diejenigen nach der Einwirkung von aussalzenden und lösenden Körpern, sowie diejenige nach der schliesslichen Verteilung des Wassers zwischen den zwei Lösungen, deren osmotischer Druck wohl = 0 sein soll, blieben bisher unerörtert. Vielleicht wird irgend einer der Leser dieses Blattes geneigt sein, darauf weiter einzugehen, weil dabei in chemisch-physikalischer Richtung etwas Licht auf die Kolloidalstruktur fallen dürfte.

Kulturversuche mit Amöben auf festem Substrate.

Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde, Jena, I. Abteilung, XIX Band, 1896, S. 257—267.

Ich will in Folgendem die Lebensgeschichte zweier Amöben besprechen. Obschon die Resultate mit der in Alkoholrohgärungen aufgefundenen Amoeba zymophila die interessanteren sind, weil dadurch unser Laboratoriumsmaterial mit einem nicht unwichtigen Objekte vermehrt wird, will ich doch auch meine schon älteren Beobachtungen bezüglich einer sehr gemeinen Erdamöbe anführen, weil dieselben in morphologischer Hinsicht, wie ich glaube, einige neue Daten enthalten. Ich will letztere Art, wegen ihres gemeinsamen Vorkommens mit den Nitritfermenten der Ammonsalze, A. nitrophila nennen [1]).

I. Amoeba nitrophila.

Vor einigen Jahren habe ich gezeigt, dass das Nitritferment der Ammonsalze mit Leichtigkeit auf Agarplatten gezüchtet werden kann, vorausgesetzt, dass die löslichen organischen, im Agar vorhandenen Körper daraus vermittelst destillierten Wassers entfernt und die notwendigen anorganischen Salze gegenwärtig sind. Das Verfahren ist wie folgt:

Filtriertes, in destilliertem Wasser gelöstes Agar wird in einen Erlenmeyer'schen Kolben in nicht zu dicker Schicht zum Erstarren gebracht, mit destilliertem Wasser übergossen und ruhig sich selbst überlassen. Die löslichen Körper diffundieren in das Wasser hinüber und in diesem entsteht gewöhnlich eine spontane Bakterienkultur. Nach einigen Tagen wird das Wasser abgegossen und erneuert und dieses wird mehrmals wiederholt. Nach einer Woche bis 14 Tagen, abhängig von der Dicke der auszulaugenden Schicht, sind die löslichen organischen Substanzen genügend aus dem Agar entfernt, um das Wachstum der Nitritfermente zu ermöglichen.

Die Masse wird nun mit dem zur Nitritbildung geeigneten Salzgemisch sowie mit reinem präcipitiertem Calciumcarbonat versetzt und damit aufs neue gekocht, wodurch die einzelnen anhängenden Bakterien getötet werden und nach dem Übergiessen in eine Glasdose ein sich für das Wachstum des Nitritfermentes ganz ausgezeichnet eignender steriler Kulturboden erhalten wird. Wie man sieht, ist diese Methode viel einfacher wie das Kieselsäureverfahren und nach meinen sehr zahlreichen Versuchen auch viel besser geeignet, um das in mehreren Modifika-

[1]) Celli und Fiocca (Centralbl. f. Bakteriol., Bd. XV, 1894, p. 471) scheinen ein neues Kulturverfahren für Amöben entdeckt zu haben, doch erwähnen sie nicht, worin es besteht. Auch in ihrer zweiten Mitteilung (l. c. Bd. XVI, 1894, p. 320) lüften sie den Schleier ihres Geheimnisses nicht.

tionen vorkommende Nitritferment zum Wachstum zu bringen. Von den zur Nitritbildung vorzuschlagenden Ammonsalzen kann ich ganz besonders das Phosphorsalz ($NH^4NaHPO^4 + 4H^2O$) empfehlen, welches beim Kochen das Agar nicht angreift und deshalb nicht zur Neubildung löslicher organischer Produkte aus dem Agar Anlass giebt, was wenigstens beim längeren Kochen mit Chlorammon zu befürchten ist, obschon ich auch diesen Körper vielfach mit gutem Resultate verwendet habe. Bei Phosphorsalz konnte bis 0,5 Proz. zugesetzt werden, ehe eine Verminderung des Oxydationsvorganges bemerkbar wurde, jedoch ist ein geringerer Gehalt, z. B. 0,2 Proz., vorzuziehen. Neben dem Ammonsalze soll ca. 0,05 Proz. Chlorkalium zugesetzt werden. Durch die Kreide bleibt die Reaktion neutral oder schwach alkalisch.

Die auf diese Weise angefertigten Platten erlauben die üppige Kolonieenbildung mehrerer charakteristischer Boden- und Wasserbakterien; überdies geben sie zu einer direkten Schätzung des Reichtums an Nitritmonaden in einem Bodenmuster Veranlassung. Ich verreibe dazu das Bodenmuster in reinem Wasser, schüttele lange und kräftig und übergiesse die Agarkreideplatte damit. Auch in der Dose selbst wird geschüttelt, um das Sichabsetzen der Bodenteilchen zu verhindern; das Wasser samt der darin schwebenden Suspension wird dann abgegossen und gemessen, wodurch das am Agar hängenbleibende Wasservolumen ziemlich genau bekannt wird. Da das Agar sich sehr gleichmässig benetzt, kommt alles, was auf diesem Boden keimen kann, in gleichmässiger Verteilung zur Entwicklung. Das Nitritferment wird meistens erst nach fünf oder noch mehr Tagen sichtbar und ist sofort kenntlich an dem hellen Zirkelfelde, welches rings um die Kolonien entsteht infolge der Bildung von freier salpetriger Säure aus dem Ammoniak, wodurch die Kreide lokal gelöst wird. Übrigens liegt die Besprechung der Nitritfermente und ihrer Symbionten ausser meinem Zwecke, und ich will nun zur Schilderung des bei diesen Versuchen beinahe ausnahmslosen Auftretens einer sehr eigentümlichen, sporenerzeugenden Erdamöbe auf den Agarplatten übergehen. Die nämliche Amöbe wird übrigens auch auf den Kieselplatten gefunden, welche für die Nitrifikationsversuche hergestellt werden [1]). Ich habe mich besonders mit Gartenerde aus Delft beschäftigt und daraus immer eine und dieselbe Erdamöbe erhalten, worüber eben infolge des charakteristischen Vorganges der Sporenerzeugung kein Zweifel blieb. Das Agarverfahren erlaubte den Entwicklungsgang lückenlos zu verfolgen.

---

[1]) Die kreidehaltige Kieselplatte stelle ich auf eine einfachere Weise her wie Winogradsky. Ich verfahre wie folgt: Wasserglas des Handels wird mit Halbnormalsalzsäure genau titriert. Durch Versuche wird nun festgestellt, wie viel Teile Wasserglas, Halbnormalsalzsäure und mit Kreide angerührtes Wasser erfordert werden, um durch Vermischen derselben und sofortiges Giessen in eine Glasdose eine nicht allzuschnell erstarrende, blendend weisse Kieselschicht von der gewünschten Konsistenz und Festigkeit zu erzeugen. Die drei Ingredienzen werden beim Anfange des Versuches in drei kleine Bechergläser genau abgemessen. Da das Erstarren mehrere Sekunden auf sich warten lässt, hat man volle Zeit zum vollständigen Vermischen und ruhigen Giessen in die Glasdose. Man findet, dass die besten Platten ca. 3 Proz. SiO^2 enthalten und dass bei der Herstellung eine kräftige alkalische Reaktion das Erstarren begünstigt, sodass die Salzsäure nicht alles Wasserglas neutralisieren soll. Die so hergestellten Platten werden nun, zur Entfernung des Chlorkaliums, zunächst mit gekochtem destilliertem Wasser ausgelaugt, schliesslich mit einer gekochten Lösung des zur Nitrifikation bestimmten Salzgemisches übergossen. Es ist sehr schwierig, Kieselplatten völlig zu sterilisieren, sodass das Agarverfahren in jeder Beziehung den Vorzug verdient.

Sobald die Nitritfermentkolonieen durch das lokale Durchsichtigwerden des Bodens sich anzeigen, sieht man mit der Lupe da und dort auf der Platte körnige Stellen auf der glänzenden Oberfläche der Agarplatte, welche ihren Glanz verloren haben und aus Ansammlungen unserer Amöbe bestehen. Diese Stellen dehnen sich allmählich aus und schliesslich kann die ganze Platte mit Amöben überdeckt sein. Gewöhnlich ist dieses jedoch nicht der Fall, und es ist leicht, sich zu überzeugen, dass die Anhäufung des Calciumnitrits dem Amöbenwachstum hinderlich ist. Verfolgt man die Ausbreitung der Amöbe genauer, so bemerkt man, dass dieselbe besonders durch die Häufigkeit und die Ausdehnung der zahlreichen n e b e n dem Nitritferment auf der Platte liegenden Bakterienkolonieen bedingt ist, dass die Amöben sich mit den Bakterien ernähren und nur sehr wenig weit kriechen, sobald ihnen die Nahrung fehlt, dagegen bei dichter Aussaat der Erdbakterien sich ziemlich schnell von Kolonie zu Kolonie bewegen, um bald die ganze Platte zu besiedeln. Das Überbringen auf andere Platten ist nicht in allen Fällen gelungen, oft scheinen die chemischen Differenzen zwischen altem und neuem Kulturboden mit dem Leben dieser Amöbe unverträglich zu sein, sodass diese Form für eine umfangreichere Versuchsanstellung genaue Überwachung erfordert. Es ist nicht unbedingt nötig, doch am besten, zunächst eine Bakterienkultur auf den Platten sich entwickeln zu lassen und dann die Amöben zu impfen. Für die mikroskopische Untersuchung ist indessen das Rohmaterial, welches auf die angeführte Weise so leicht und in so reichem Masse zu erhalten ist, sehr wertvoll.

Unsere Amöbe (Taf. VII, Fig. 1) gehört zu den grösseren Arten und misst 15—20 μ. Die Körpersubstanz ist sehr hyalin und zeigt den einzelnen Zellkern (*N*) mit besonderer Deutlichkeit. Meistens werden zwei Vacuolen gefunden, wovon die eine langsam pulsiert (*p Fig. 1*), während die andere ruht. Mit der pulsierenden Vacuole in Verbindung stehen oft 3 kleine Nebenvacuolen (*n*), ganz wie bei P a r a m a e c i u m. Die nicht pulsierenden Vacuolen liegen vereinzelt und werden durch allgemeine Körperkontraktionen zur Entleerung an die Oberfläche geführt. Teilungsvorgänge können mit grosser Klarheit verfolgt werden, besonders bei den jungen, eben aus den Sporen schlüpfenden Amöben (Fig. 4), wobei sich ergiebt, dass die zwei Teilprodukte gleich sind und Körnerplasma sowie hyalines Plasma sich durch Einschnürung gleichhälftig teilen. Auch die pulsierende Vacuole teilt sich bei der Vermehrung.

Das eigentliche Interesse liegt aber in der Sporenbildung, wodurch dieses Tier eine grosse Analogie zu den Myxomyceten zeigt, und sich davon nur dadurch unterscheidet, dass ein Myxamöbenstadium und Copulationserscheinungen fehlen. Übrigens ist die Zahl der Sporen nur gering, ein oder zwei, sehr selten drei (Fig. 1 und 2), doch kann dabei nicht von Encystierung geredet werden, weil nur ein Teil der Körpersubstanz für den Prozess in Anspruch genommen wird. Inzwischen sind die Sporen sehr gross und messen 10—11 μ. Nur dann, wenn zwei oder drei Sporen in einer Amöbe entstehen, sind ein oder zwei derselben kleiner.

Die Sporenwand ist doppelt. Das Exospor (*ex* Fig. 2) hat eine sehr unregelmässige Oberfläche und macht den Eindruck einer erhärteten Schaumschicht, welche dem Ursprung derselben, nämlich Erstarrung eines Teiles des vacuolisierten Protoplasma der Mutteramöbe entspricht. Das Endospor (*en* Fig. 2) ist dagegen überall von gleicher Dicke. Es liegt entweder dem Exospor überall angeschmiegt oder kann

davon an gewissen Stellen getrennt vorkommen, sodass dann die Spore in einem Sack zu liegen scheint. Die Sporen zeigen einen sehr deutlichen Zellkern.

Bei Überbringung der Sporen von einer alten Agarplatte in die feuchte Kammer in destilliertes Wasser konnte die Sporenkeimung beobachtet werden.

Hierbei (Fig. 3) verschwindet das Exospor, während das Endospor aufklappt und die kleine Amöbe aus der Spalte herauskriecht. Ein hyaliner Körperteil geht dabei voran, dann folgt die Vacuole und sofort hinter derselben der Zellkern. Man bekommt deshalb den Eindruck, dass die Vacuole schon in den Sporen existieren muss und zwar in Einzahl. Die so gebildete Vacuole pulsiert und zeigt Nebenvacuolen (*p* und *n* Fig. 3). Die kleinen Amöben bewegen sich lebhaft und einzelne davon sah ich durch einen eigentümlichen Kontraktionsprozess eine ganze Vacuole samt Vacuolenwand abstreifen, was den Eindruck macht, als ob ein Ei gelegt wurde (*v* Fig. 3).

Wie schon angeführt, konnte ich besonders bei diesen jungen Amöben leicht die Teilung beobachten, wobei die Trennung derweise erfolgt (Fig. 4), dass die beiden Tiere den Kern voran, und die pulsierende Vacuole diesem nachfolgend, sich von einander entfernen. Offenbar hat der Kern sich also zunächst geteilt, die Vacuole erst nachträglich. Dass die Vacuole sich in diesem Falle durch Einschnürung teilt, habe ich sicher beobachtet, doch konnten während dieses Vorganges die Nebenvacuolen nicht gesehen werden. Die nicht pulsierenden Vacuolen entstehen unabhängig von den pulsierenden nicht durch Teilung, sondern spontan an unbestimmter Stelle im Körnerplasma.

Die jungen Amöben messen 10 bis 12 μ und müssen also beträchtlich wachsen, um die definitive Grösse zu erreichen.

A m o e b a n i t r o p h i l a muss in Gartenerde sehr verbreitet sein, denn aus jedem Decagramm Erde, und noch weniger, habe ich dieselbe beinahe ausnahmslos auf meinen nitrifizierenden Agarplatten gefunden. Wenn zufällig keine Nitrifikation eintrat, kamen dennoch die Amöben zur Entwicklung, und ich bin durchaus überzeugt, dass ausgewaschene Agarplatten auch für die Kultur anderer Amöbenarten sehr geeignet sind.

II. A m o e b a z y m o p h i l a [1]).

Anfang September 1895 erhielt ich aus einem Garten in Gelderland Trauben, welche durch Wespen angenagt und in spontane Gärung geraten waren.

Bei der Mikrobenkultur aus der braunen fauligen Masse erhielt ich zunächst S a c c h a r o m y c e s a p i c u l a t u s, ein P e n i c i l l i u m-Arten, eine eigentümliche dimorphe Glukosehefe, worauf ich später zurückzukommen hoffe, und eine Essigbakterie. Überdies ergaben Striche auf Malzextraktgelatine, direkt mit dem fauligen Materiale angelegt, eine Amöbenart in sehr bemerkenswerter Erscheinungsform, wodurch mein Interesse besonders in Anspruch genommen und die fernere Versuchsanstellung bestimmt wurde.

---

[1]) Vielleicht identisch mit A m o e b a c o l i Loesch. (V i r c h o w's Archiv. Bd. LXV. 1875, p. 196.)

Das Vorkommen von Amöben in gärenden Massen ist eine schon mehrfach beobachtete Erscheinung. So sagt Lindner[1]): »Ausser auf Gipsblöcken konnte Verfasser ein massenhaftes Auftreten von Amöben in einem stark gärenden Fruchtsafte, der einige Tage lang in einem offenen Gefässe im Zimmer gestanden hatte, konstatieren. Der Saft war ziemlich stark sauer. Die Amöben zeigten sich äusserst lebendig und trieben auch hier ihre Jagd auf Hefezellen.« In Hefekulturen auf Gipsblöcken und Möhrenscheiben wurden auch oft hefefressende Amöben gesehen. Jedoch ist das Vorkommen derselben unter letzterem Umstande mehr in Übereinstimmung mit demjenigen in Schlamm und Wasser, das heisst in Medien von neutraler oder schwach alkalischer Reaktion, während die saure Reaktion von Trauben und gärenden Fruchtsäften die Gegenwart von Amöben besonders bemerkenswert erscheinen lässt.

Die von mir isolierte Amöbe ernährt sich mit Apiculatushefe und Essigbakterien. An gewöhnliche Presshefe oder Bierhefe konnte ich dieselbe bisher nicht gewöhnen, vielleicht sind die ca. 8 μ messenden Zellen letzterer Hefen zu gross, um in relativ kleinen, höchstens 10 bis 12 μ grossen Amöbenkörper zum Zwecke der Ernährung einverleibt zu werden[2]). Die 4 und 5 μ messende Apiculatushefe ist dagegen besser mit den Dimensionen der Amöben in Übereinstimmung, um als Nahrungsballen aufgenommen zu werden, was natürlich nicht weniger gilt für die ca. 1,5 bei 2 μ messenden Essigbakterienarten der gärenden Trauben.

Meine ersten Kulturen fanden auf Malzgelatineplatten statt. Die Art und Weise des Vorkommens der Amöben auf diesen Platten ist sehr bemerkenswert. Schon aus den ersten Impfstrichen des von den Trauben herrührenden Rohmaterials krochen nämlich an bestimmten Stellen die Amöben in Scharen hervor und erzeugten stellenweise einen schleierartigen Belag auf der Platte. (Vgl. *s* Fig. 5 u. 6). Doch muss ich bemerken, dass ich die Erscheinung nicht sofort richtig erklärte, da ich anfangs den Schleier für eine Ausbreitung von Essigbakterien hielt, wovon bestimmte Arten ein starkes Bestreben haben, Ausläufer an den Kolonieen zu erzeugen. Inzwischen wurde diese Ansicht durch das Mikroskop widerlegt. Es war nun dieser »Amöbenschleier«, welcher zunächst zu ferneren Isolierungsversuchen Veranlassung gab und zwar mit folgendem Resultate.

Als ich mit dem Platinfaden Impfmaterial, aus dem Amöbenschleier herstammend, auf eine neue Malzextraktgelatineplatte überbrachte, kamen daraus zu meiner Verwunderung anfangs nur Apiculatus- und Essigbakterienkolonieen zur Entwicklung. Als diese Kolonieen aber einige Tage später untersucht wurden, ergab sich, dass ringsum mehrere der Hefekolonieen aufs neue ein »Amöbenschleier« entstanden war. Wurden mit diesem Schleier die Impfversuche wiederholt, so wiederholten sich

---

[1]) Mikroskopische Betriebskontrolle im Gärungsgewerbe, 1895, p. 35.

[2]) Im Grabenwasser giebt es, obschon selten, viel grössere Amöben, welche sich sehr begierig mit Hefezellen ernähren. So habe ich einige Male mit Grabenwasser aufgerührte, im Thermostaten bei ca. 24° C aufbewahrte Presshefe im Laufe von 24 Stunden zu meinem Erstaunen gänzlich verschwinden und buchstäblich sich in eine Amöbenmasse umwandeln sehen. Die Erscheinung war offenbar mit der zufälligen Abwesenheit gewisser Bakterien im Zusammenhang, und die ganze Masse veränderte sich in eine faulige Flüssigkeit, worin die Amöbenkörper starben, augenscheinlich sobald Sauerstoffmangel entstand.

auch die nämlichen Erscheinungen mit dem Unterschied, dass die Essigbakterienkolonieen viel seltener wurden. Bei dritter oder vierter Überimpfung eines rings um Hefe liegenden »Schleiers« waren die Essigbakterien gänzlich verschwunden und es war eine »Reinkultur« von Amöben + Saccharomyces apiculatus hergestellt. Offenbar waren während der ersten Überimpfungen einzelne Amöben abgestorben, wodurch im Amöbenkörper eingeschlossene Essigbakterien, welche noch lebend geblieben waren, frei kamen und weiter wachsen konnten.

Obschon die Kolonieen der Essigbakterien in den Impfstrichen auf Malzextraktgelatine, welche von einem Amöbenschleier der ersten Rohkulturen herkünftig waren, keine Amöbenschleier aufwiesen, fehlten die Amöben darin jedoch nicht. Als ich von diesen Kolonieen auf gleichem Boden neue Impfstriche machte, so konnte nicht nur eine Vermehrung der Bakterien, sondern auch der Amöben, wieder mit der Erscheinung der Schleierbildung, erzielt werden. Merkwürdigweise kamen auch in diesen Impfstrichen anfangs einige Apikulationskolonieen zur Entwicklung, doch nur sehr vereinzelt, sodass es leicht wurde, schliesslich eine zweite Reinkultur darzustellen, welche aus Amöben + Essigbakterien bestand. Auch hier waren also im Anfange noch lebende Apiculatuszellen im Amöbenkörper, welche, nachdem dieser abgestorben war, zum Wachstum gelangen konnten [1]).

Sowohl die Kulturreihen Amöben + Apiculatus und Amöben + Essigbakterien, wie Amöben + Apiculatus + Essigbakterien lassen sich, leicht in Reihenkulturen auf Nährgelatine und auf Nähragar in Reagentienröhrchen fortführen, sodass ich heute, Mitte Dezember, diese drei verschiedenartigen Amöbenvegetationen seit September mit unveränderten Eigenschaften vor mir habe [2]). Schwieriger ist es aber in Nährflüssigkeiten die Amöbenkulturen fortzuführen, während die mikroskopische Struktur eben besonders gut in solchen Kulturen zu verfolgen ist. Am besten bin ich in dieser Beziehung mit solchen Flüssigkeiten ausgekommen, worauf sich, bei geringer Alkohol- und Säurebildung eine Kahmhaut irgend einer kleinzelligen Hefeform entwickelte. Die Amöben, welche den Sauerstoff suchen, siedeln sich dann in der Kahmhaut an. Da die Kulturen auf festem Boden jedoch viel leichter reinzuhalten, dauerhafter und überhaupt viel leichter zu beurteilen und zu führen sind, habe ich mich zunächst nur mit diesen beschäftigt und nur darüber möchte ich augenblicklich berichten.

Da die Apiculatushefe und die Essigbakterien auch auf Fleischwasserpepton-Gelatine und -Agar nach der gewöhnlichen Vorschrift dargestellt, zur Entwicklung kamen, versuchte ich meine Amöbenkulturen darauf zu übertragen. Dieses ist sofort gelungen und in mancher Beziehung sind eben diese Kulturböden den Malzextraktpräparaten vorzuziehen, besonders wenn es »Essigbakterien + Amöben« gilt. Es ergiebt sich nämlich, dass die Schleierbildung dabei sehr schön auftritt (Fig. 6) und zwar ebenso sicher, wie bei der Apiculatus + Amöbenkultur (Fig. 5) auf Fleischgelatine und Fleischagar. Die Erklärung der Leichtigkeit der Schleierbildung auf

[1]) Auf die so seltenen Ascosporen von S. apiculatus, deren Existenz ich früher angegeben habe, konnten diese Kolonieen nicht zurückgeführt werden, wenigstens konnte ich bisher bei dieser Apiculatusfamilie keine Sporen auffinden.

[2]) Während des Druckes dieser Abhandlung vermehrte ich diese Kulturreihen noch mit der Kombination Amoeba zymophila und Bacterium coli commune, welche in allen Hinsichten mit der Essigbakterienkombination übereinstimmt.

diesem Boden suche ich in der geringeren Säurebildung, verglichen mit derjenigen, welche die Essigbakterien auf Malzextraktgelatine veranlassen [1]) und welche die Beweglichkeit der Amöben herabsetzen dürfte, sodass die Amöben auf Fleischwassergelatine leichter im stande sind, wegzukriechen. Weshalb sie aber überhaupt sich von der Hefe oder den Essigbakterien entfernen, ist nicht so ganz klar. Es dürften dabei chemotaktische Prozesse in Betracht kommen, und zwar entweder eine Abstossung durch Exkretionsprodukte, oder eine aërotaktische Anziehung. Jedoch gelang es mir noch nicht, Chemotaxis sicher nachzuweisen, obschon das Material und die Erscheinung der Schleierbildung für solche Versuche wie geschaffen erscheinen.

Wenn nach diesen Angaben Fleischgelatine und Fleischagar für Versuche in Bezug auf die Schleierbildung zu empfehlen sind, so ist andererseits für die Fortführung der Reihenkulturen Malzextraktgelatine unbedingt vorzuziehen, weil darauf Apiculatushefe und Essigbakterien viel besser wachsen und viel länger lebendig bleiben.

Ich muss nun eine Erscheinung beschreiben, welche mir sehr bedeutungsvoll zu sein scheint. Ich meine das starke Verflüssigungsvermögen, welches die Amöben auf die Nährgelatine ausüben. Es ergiebt sich nämlich, dass alle Kulturen, besonders aber diejenigen auf Malzextraktgelatine, schliesslich so stark verflüssigt sind, als ob irgend eine kräftig peptonisierende Bakterienart vorliegt. Die Verflüssigung beginnt eher bei Apiculatus + Amöben, wie bei Essigbakterien + Amöben, was ich darauf glaube zurückführen zu müssen, dass das Enzym ein tryptisches Enzym ist, welches etwas besser wirkt bei neutraler Reaktion, wie bei der mit dem Essigbakterienwachstum unvermeidlich stattfindenden Säurebildung. Ganz aufgeklärt ist die Verschiedenheit allerdings nicht, denn selbst bei schwach alkalischer Reaktion der Nährgelatine ist der Unterschied bemerkbar. Bekanntlich kann aber nicht immer aus dem Verhalten der Nährgelatine Lakmus gegenüber mit Sicherheit auf die Reaktion kräftig darauf vegetierender Kolonieen geschlossen werden, weil diese z. B. so viel Base oder Säure abscheiden können, dass die aus der Ferne zufliessende Säure, resp. Base dadurch mehr als neutralisiert werden kann [2]).

Als ich die Verflüssigung durch meine Amöbe zuerst kennen lernte, glaubte ich darin einen Fingerzeig zu finden, dass Ernährung durch Diffusion stattfinden müsste. Denn warum sollte die Amöbe ausserhalb ihres Körpers peptonisieren, wenn nicht zum Zwecke der Aufnahme von den dabei entstehenden diffusibelen Körpern? Ich habe deshalb versucht, Kulturböden zu finden, welche Amöbenwachstum ermöglichen sollten, ohne die Gegenwart von Bakterien oder Hefezellen. In dieser Beziehung ist aber alles vergebens gewesen: die Amöben ernähren sich überhaupt nicht durch diffusibele Körper, welche von aussen kommen, sondern nur ausschliesslich mit festen Stoffen. Ich glaube, dass dadurch erwiesen ist, dass das Enzym ein nutzloses Exkretionsprodukt ist, welches, nur solange es im Amöbenkörper selber gegenwärtig

[1]) Die Säure bildet sehr schwer krystallisierbare Kalksalze. Sie ist nicht flüchtig und dürfte irgend eine Oxydsäure von Maltose oder Glukose sein.

[2]) Hierauf beruht auch die Erscheinung, dass eine dicke Nährgelatineschicht bei den Zählversuchen eine andere (meistens eine kleinere) Kolonieenzahl ergiebt wie eine dünne Schicht, weil eben diejenigen Bakterienarten, welche keine Optimumbedingungen vorfinden, bei dicken Schichten die in einer Halbkugel, bei dünnen die in einer »Zirkelfläche« vorhandenen entwicklungshemmenden Körper überwinden müssen.

ist, funktioniert, ähnlich also wie die Amylasen, welche sich in unserem Körper im Urin vorfinden. Wieder ein Beitrag für die überall sich wiederholende Erscheinung, dass die Natur verschwenderisch ist bezüglich der Enzyme und ganz in Übereinstimmung mit meiner Beobachtung, dass die Malzdiastase und das Pancreastrypsin an sich nicht für die Ernährung der Hefe und der Bakterien (und wohl der Zelle überhaupt) dienlich und deshalb wohl keine Eiweisskörper sind.

Die Ausscheidung des Enzyms aus den Amöben findet wahrscheinlich nicht durch Diffusion statt, sondern durch Entleerung der Vacuolen. Wenigstens ist es sicher, dass die Vacuolen, ebenso wie bei vielen anderen Protozoen durch Protoplasmabewegung an die Hautschicht geführt werden, und diese schliesslich durchbrechen. Da eine ausgestossene Vacuolenwand sich nicht beobachten läßt, muß angenommen werden, dass diese in der Hautschicht des Amöbenkörpers aufgenommen wird, und damit vielleicht identische Eigenschaften besitzt. Pulsierende Vacuolen werden nicht gefunden. Zwei bis vier gewöhnliche Vacuolen scheinen die Exkretion überhaupt zu besorgen. Dass diese Vacuolen auch die Entleerung der von den Apiculatuszellen und den Essigbakterien übrig bleibenden Reste bewirken, wurde bei ersteren direkt gesehen, ist also für letztere sehr wahrscheinlich.

Diastase, welche im Pancreassekret bekanntlich das Trypsin begleitet, fehlt im Amöbenkörper vollständig. Glukase und Invertase, welche sich durch die Mycodermamethode so überzeugend nachweisen lassen, fehlen ebenfalls.

Die Trypsinbildung bestimmt natürlich die äusseren Wachstumserscheinungen in den Kolonieenkulturen. Solche »Kolonieenkulturen« unserer Amöbe sind sowohl mit Apiculatus + Amöben wie mit Essigbakterien + Amöben leicht zu erhalten. Ich verfahre daher auf die nämliche Weise, wie ich schon vor Jahren für die Hefereinkultur auf Gelatine beschrieben habe. Die Gelatineplatte findet sich in einer Glasdose mit einem aufgeschliffenen Deckel. Das Aussaatmaterial wird in einem Kölbchen mit sterilisiertem Wasser verteilt und dieses über die Platte gegossen und sofort entfernt, wodurch nur eine gleichmässige Benetzung stattfindet. Bei ca. 20° C werden nach 24 Stunden die Apiculatuskolonieen, nach ca. zweimal 24 Stunden die Essigbakterienkolonieen sichtbar, sowohl auf Malz- wie auf Fleischgelatine. Bei solchen Versuchen bleiben einzelne Amöben mit Hefezellen verklebt, oder vereinzelte Essigbakterien mit Amöben, weitaus die Mehrzahl der Amöben wird natürlich ganz frei kommen. Die letzteren erzeugen überhaupt keine Kolonieen oder nur für so weit sie absterben vielleicht Apiculatus- oder Essigbakterienkolonieen. Dagegen werden die relativ seltenen Hefezellen oder Bakterien, welche mit Amöben verklebt waren, Kolonieen bilden können, worin die Amöben sich dann wieder weiter entwickeln werden. Diese Kolonieen nun sind selbst in ganz dichten Aussaaten sofort kenntlich an der »Schleierbildung«, welche, wie nach früheren Angaben zu erwarten war, sich bei der Apiculatushefe sowohl auf Malz- wie auf Fleischboden, bei den Essigbakterien besser auf Fleischboden zeigt. Da die Schleierbildung sich auf mehrere (z. B. bis 20) Millimeter Entfernung von den Kolonieen bemerkbar macht, kann sie leicht zu einer sekundären Infektion benachbarter Kolonieen, und unter Umständen schliesslich zu einer umfangreichen, oder selbst totalen Amöbeninvasion über die gesamte Oberfläche der Kulturplatte Veranlassung geben. Eben durch diese Erscheinung der Infektion entfernt liegender Kolonieen, welche wieder ein Heer daraus kriechender Amöben erzeugen, wird es deutlich, dass die Amöben sich nur durch die

Aufnahme fester Nahrung erhalten können. Die im Schleier vorkommenden Amöben sterben unvermeidlich, auf welchem Kulturboden sie sich auch vorfinden, sofern sie nicht neue Hefe oder Bakterienkolonieen infizieren und zur Nahrung verwenden können, woraus zugleich erhellt, dass sie nicht mehr auf ihre Schritte zurückkehren.

Amoeba zymophila führt einen Zellkern. Dieser ist besonders gut in den Essigbakterienkulturen zu beobachten (Fig. 10), während dieses bei der Ernährung mit Hefe (Fig. 9) schwierig ist infolge der Ähnlichkeit der hefeführenden Nahrungsvacuolen mit dem Zellkern, weil letzterer aus einem von einem Hofe umgebenen Centralkörper besteht, und dieser Centralkörper sich Farbstoffen gegenüber so verhält wie die in den Vacuolen eingeschlossenen Apiculatuszellen. Bringt man die Amöben von den Gelatineplatten in destilliertes oder in Leitungswasser über, so sieht man viele davon aufplatzen. Bei einer genauen Durchmusterung dieser verquollenen Körpermasse findet man darin neben den leicht kenntlichen Bakterienresten einige dem Kern nicht unähnliche Granula, welche im Wasser ihre Form nicht weiter verändern (*g* Fig. 12). Ich zählte davon zwei bis acht in verschiedenen Amöben, konnte über deren Bedeutung aber nichts weiteres feststellen. Sporen- oder Cystenbildung habe ich überhaupt nicht beobachten können. Die Vermehrung findet nur durch Teilung statt und diese nimmt offenbar einen schnellen Verlauf, denn es gelingt nur selten, selbst in den üppigst wachsenden Kulturen, sich teilende Amöben aufzufinden.

Handelt es sich darum, die Pseudopodienbildung und die Fortbewegung der Tiere zu sehen, so ist es am besten, beim Mikroskopieren verdünnte Nährlösungen zu verwenden, deren Konzentration derjenigen der Kulturböden entspricht, weil andernfalls die Amöben sich gänzlich abrunden und so lange in diesem Zustande ohne Pseudopodien verharren, bis die Kugeln, so weit sie nicht sofort geplatzt, in osmotisches Gleichgewicht mit der Umgebung gekommen sind. Im Kugelzustand (Fig. 11) zeigt das Protoplasma eine eigentümliche Netz- oder Schaumstruktur, welche nicht mit der Vacuolisierung zu verwechseln ist, sondern auf eine dualistische Natur des Protoplasmas selbst hinweist. Die 2 bis 4 Vacuolen lassen sich nämlich auch in den Kugeln leicht auffinden. Die Erscheinung macht den Eindruck, als ob das hyaline Protoplasma, welches gewöhnlich excentrisch liegt und zur Pseudopodienbildung Veranlassung giebt, sich in das Körnerplasma zurückzieht und letzteres dabei sich zur Raumschaffung netzartig anordnet.

Pulsierende und Nebenvacuolen, wie bei A. nitrophila, habe ich hier nicht finden können, wie die Differenzierung von A. zymophila überhaupt auf einer niederen Stufe steht, wie bei jener Art.

Die Leichtigkeit des Kulturverfahrens und das hohe wissenschaftliche Interesse von Amoeba zymophila veranlassen mich schliesslich noch zu bemerken, dass ich gern meine Kulturen zur Verfügung anderer Forscher stellen will.

Delft, 25. Dezember 1895.

Figurenerklärung zu Tafel VII.

Fig. 1 bis 4. Amoeba nitrophila, Fig. 5 bis 12 A. zymophila, *N* Zellkern, *p* pulsierende Vacuole, *n* Nebenvacuolen, *v* ruhende Vacuolen.

Fig. 1 (650). Amoeba nitrophila, mit und ohne Sporen. Links unten eine Amöbe mit pulsierender Vacuole *p*, welche durch feine Kanäle mit drei Nebenvacuolen *n* zusammenhängt. In anderen Amöben zwei Vacuolen, wovon eine ruhend.

Fig. 2 (1100). Sporen von A. nitrophila; *ex* Exospor, *en* Endospor.

Fig. 3 (650). Sporenkeimung und (rechts) Vacuolenabtrennung bei einem Keimling.

Fig. 4. (650). Junge Amoebe sich teilend in drei Stanien α, β, γ. Bei γ pulsierende Vacuole mit Nebenvacuolen sichtbar.

Fig. 5. Kolonie *a* von Saccharomyces apiculatus, mit »Schleier« *z* von Amoeba zymophila auf Nährgelatine.

Fig. 6. Strich *e* von Essigbakterien mit »Schleier« *z* von A. zymophila auf Nährgelatine.

Fig. 7 (650). Apiculatushefe mit A. zymophila.

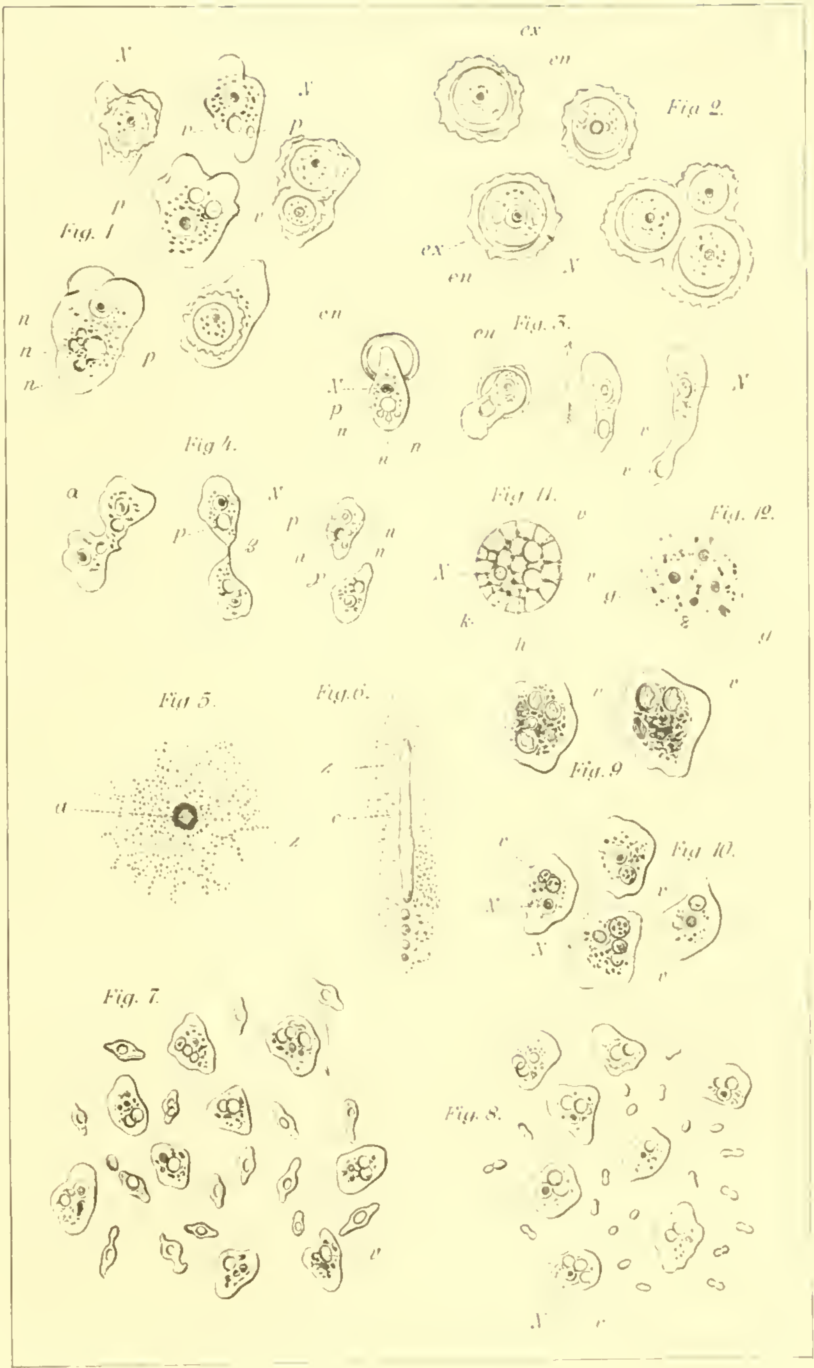
Fig. 8 (650). Essigbakterien mit A. zymophila.

Fig. 9 (1100). A. zymophila mit eingeschlossenen Apiculatuszellen, teilweise in Nahrungsvacuolen *v*. Kern undeutlich.

Fig. 10 (1100). A. zymophila mit eingeschlossenen Essigbakterien, diese teilweise in Nahrungsvacuolen. Kern sehr deutlich.

Fig. 11 (1100). In Wasser kugelig gewordene Amöbe aus Essigbakterienkultur. Das Körnerplasma *k* bildet ein Netz in hyalinem Plasma *h* (schattiert gezeichnet). Die Vacuolen *v* und der Kern *N* deutlich.

Fig. 12 (1100). In Wasser aufgeplatzte Amöbe aus Essigbakterienkultur, zeigt neben Bakteriendetritus 5 Granula *g*.


Fig. 1
Fig. 2.
Fig. 3.
Fig. 4.
Fig. 5.
Fig. 6.
Fig. 7.
Fig. 8.
Fig. 9
Fig. 10.
Fig. 11.
Fig. 12.

Sur la cécidiogénèse et la génération alternante chez le Cynips calicis.

Observations sur la galle de l'Andricus circulans.

Archives Néerlandaises des Sciences Exactes et Naturelles, Haarlem, Tome XXX, 1897, p. 387—444. — Eene voorloopige mededeeling hierover verscheen onder den titel »Over de levensgeschiedenis van Cynips calicis, hare wisselgeneratie en de gallen daarvan« in Verslagen Kon. Akademie van Wetenschappen, Wis- en Natuurk. Afd., Amsterdam, Deel VI, 1896, blz. 61—62; verscheen compleet onder den titel »Ueber Gallbildung und Generationswechsel bei Cynips calicis und über die Circulansgalle« in Verhandelingen Kon. Akademie van Wetenschappen, Tweede Sectie, Amsterdam, Deel V, No. 2, 1897.

Introduction et coup d'oeil général.

Les galles formées sur le chêne pédonculé par le *Cynips calicis* (»Knoppern« en allemand) appartiennent à bien des points de vue aux plus remarquables que l'on rencontre sur cette essence. Cela sera généralement admis pour la structure morphologique, qui correspond d'une manière caractéristique à celle du gland enfermé dans sa cupule. Il y a de plus certaines propriétés touchant le développement qui donnent à ces galles un intérêt particulier, et que je décrirai ici pour la première fois [1]).

J'ai pu notamment démontrer la génération alternante chez le *Cynips calicis*, ce qui nous fournit le premier exemple d'une génération bisexuée chez une espèce du *Cynips*, dans le sens plus restreint que M. Mayr a donné à ce genre. Cette deuxième génération correspond au genre *Andricus*, qui se distingue par sa très faible pubescence des représentants fortement velus du genre *Cynips* s. s. L,*Andricus* vit d'une manière inattendue sur le *Quercus cerris*, ce qui fait que je lui donnerai dans la suite le nom d'*Andricus* cerri [2]).

On voit par ce qui précède que le *Cynips salicis* ne peut parcourir son cycle vital, que son existence n'est assurée, que si les deux espèces de chêne, le chêne pédonculée et le chêne de Bourgone, sont réunies dans les mêmes massifs à peu de distance l'une de l'autre. Cette circonstance explique pourquoi une guêpe gallicole si extraordinairement bien armée pour la lutte pour l'existence, telle que le *Cynips calicis*, n'est généralement répandue que dans la patrie proprement dite du cerris, c'est-à

---

[1]) Mon travail était déjà achevé dans ses grandes lignes dans le cours de l'année précédente. J'en ai communiqué les résultats à l'Académie des sciences d'Amsterdam le 29 juin 1895.

[2]) C'est le *Cynips cerri staminum* de ma note préliminaire.

dire dans l'Autriche-Hongrie et dans le Sud-Est de l'Europe. Son existence en Allemagne et dans les Pays-Bas est au contraire purement sporadique et évidemment déterminée par la plantation du *Quercus cerris* au milieu des massifs de chêne pédonculé. On connaît en Néerlande deux ou trois stations du *Cynips salicis*. Une de celles-ci, que j'ai régulièrement visitée depuis 1886, est située à Rheden en Gueldre. On trouve ici deux groupes de *Quercus cerris*, dont l'un est très favorablement situé au milieu de chênes pédonculés, mais dont l'autre est plus éloigné des rouvres. L'influence, sur la distribution et l'abondance des galles du calicis, de la direction du vent à l'époque où les deux générations prennent leur volée, y est très évidente.

La deuxième localité, Wijhe [1]), présente dans un bois de relativement peu d'étendue trois stations complètement distinctes de la galle du calicis, dont chacune a pour centre un petit groupe de *Quercus cerris*. La guêpe du cerris est très délicate, et ne dépose ses oeufs dans les jeunes fruits du chêne pédonculé qu'au plein soleil du midi. On ne trouve donc, au milieu de la forêt, de galles du calicis qu'au sommet des arbres; et l'on ne peut juger de leur distribution qu'en octobre, après la chûte des glands. Au contraire, les chênes pédonculés bien exposés, situés dans des endroits découverts, portent précisément la galle du calicis sur les basses branches. Il y a à Rheden plusieurs chênes pédonculés jouissant d'une exposition favorable, et c'est là-dessus que j'ai fait mes observations en plein air. Ils se trouvent au bord méridional d'une forêt, protégés contre le vent du Nord, et dans un sol très favorable, ce qui fait que les années où il y a beaucoup de glands se succèdent rapidement en cet endroit. S'il arrive qu'au commencement de mars, quand le *Cynips salicis* est en liberté, un vent d'est entraine les insectes vers les cerris, et qu'un vent d'ouest au contraire ramène, au commencement de mai, les petites guêpes du cerri vers la forêt, les galles naissent presque sur chaque gland de ces arbres favorisés.

Les conditions vitales si extraordinairement compliquées que je viens de résumer en ces quelques mots, m'ont conduit plus d'une fois à songer à l'utilité de l'hétérogénèse. Je suis persuadé du grand avantage qui s'attache à cette propriété. En effet, non seulement le nombre des oeufs de la guêpe gallicole se trouve par là en quelque sorte multiplié (environ trente fois plus grand chez la guêpe du calicis), et ceci dans le cours de 1½ à 2 mois, mais les chances de mauvais temps sont de plus réduites de moitié. En outre la différence de moeurs des deux générations doit également augmenter les chances de survie de l'espèce.

Peut-être les causes de la distribution des deux générations du *Cynips calicis* sur deux espèces de chêne différentes ne pourront-elles être découvertes que grâce à des études dans la forêt même où le *Quercus cerris* est indigène. Je dois cependant faire observer que la couleur et le revêtement de poils de la guêpe du calicis sont en harmonie parfaite avec les mêmes caractères chez les rameaux et les bourgeons du *Quercus cerris*. Il résulte de là qu'une guêpe de calicis en train de pondre ne se voit que très difficilement, ce qui serait bien moins le cas sur le *Quercus pedunculata*. On sait d'ailleurs que le *Quercus cerris* ne mûrit ses fruits que tous les deux

[1]) Je dois la connaissance de cette localité à M. C. Ritsema, Conservateur de Musée à Leyde. Il y a plusieurs années M. le Professeur Magnus de Berlin a trouvé notre galle sur le »Hemelsche Berg« près d'Oosterbeek: mais en 1895 je ne l'ai pas retrouvée (voir aussi G. Hieronymus, 68er Jahresbericht der Schles. Gesellsch. f. vaterl. Cultur, Ergänzungsheft, p. 213. 1890).

ans, et il suffit d'un coup d'oeil sur la microscopique femelle du cerri pour se convaincre que ni les fleurs si difficiles à trouver du chêne de Bourgogne de la première année, ni les jeunes glands relativement gros et durs de la seconde ne lui conviendraient.

Une grosse difficulté que j'ai rencontrée au cours de ce travail, c'est qu'une galle que jamais auparavant je n'avais trouvée sur le *Quercus cerris* est dans ces dernières années devenue très fréquente dans les Pays-Bas. Je vis cette galle se developper très fréquemment dans les filets de gaze enveloppant les branches de cerris dans lesquelles se trouvait emprisonné le *Cynips calicis*, et je me trouvai conduit à la conclusion erronée qu'elle était produite par ce *Cynips*, la deuxième génération étant donc dimorphe. Mais finalement je m'aperçus de l'état réel des choses. La galle étrangère se montra prendre naissance aux dépens d'oeufs déjà présents anterieurement dans les bourgeons. Elle n'a rien à voir avec le *Cynips calicis* et est spécifiquement identique avec l'*Andricus circulans* Mayr. C'est l'insecte que dans ma note préliminaire j'avais appelé *Cynips cerri gemmae*. Comme cette dernière galle n'est encore que très peu connue jusqu'à présent, j'en donnerai à cette occasion une description détaillée.

La facilité relative avec laquelle, une fois dans le vrai chemin, je pus arriver aux résultats ultérieurs, est due en partie à ce que le *Quercus cerris* ne présente en Hollande, sauf celles que je viens de citer, pas d'autres galles. De plus, celles de l'*Andricus cerri* ne se rencontrent qu'aux seuls endroits où l'on trouve dans le voisinage le *Cynips calicis*. J'ai profité aussi de la situation extrêmement avantageuse de la station de Rheden, où les énormes chênes pédonculés sont très abrités, et portent des branches descendant jusqu'au sol, très propres à y faire des expériences. La plupart des branches et des glands que dans mes expériences en plein air j'avais distinguées par des fils de soie purent être observés de mai à septembre dans leur complet développement. Mais les résultats de mes recherches sont dûs surtout à la réussite des expériences faites au printemps de 1896, quand je cultivai les galles du cerri sur des branches coupées, placées dans l'eau, et enveloppées de gaze, dans mon laboratoire à Delft.

Le plus proche parent de la guêpe du cerri est l'*Andricus burgundus* Giraud. La diagnose de cette dernière espèce s'applique presque littéralement à l'*Andricus cerri*. Je dirai plus tard pour quelle raison j'ai été obligé, en dépit de cette ressemblance, de considérer la guêpe de mes galles comme une espèce nouvelle. Je me contenterai de dire ici que l'amabilité de M. le professeur Wachtl à Vienne m'a fourni l'ocasion d'étudier sur des matériaux secs excellents les galles et les guêpes de l'*A. circulans* et de l'*A. burgundus* [1]).

Il ne me semble pas inutile de remarquer, à un point de vue pratique, et déjà dans cette introduction, que si l'on peut fournir la preuve de la nécessité du *Q. cerris* pour l'existence de la deuxième génération, ce fait peut donner lieu à la culture systématique des galles du *Cynips calicis*. En effet, ces galles constituent des matériaux de premier rang pour la fabrication de l'acide gallique, mais elles de-

---

[1]) La guêpe du cerri dont je m'occupe ici ressemble également si fort à l'*Andricus nudus* Adler, génération bisexuée de l'*Aphilothrix malpighi* Adler, que je ne parviens pas à distinguer les deux.

viennent de plus en plus difficiles à se procurer. On sait que ces galles sont encore aujourd'hui très estimées. On peut lire dans le travail de Burgsdorff[1]) combien on les appréciait déjà il y a un siècle; l'auteur cite le passage suivant, tiré du *Brünner Zeitung* de 1871, n° 67: »Die Knoppern haben vor Galläpfeln und jeder anderen Lohe den Vorzug, weil sie ungleich mehr von der adstringirenden Kraft besitzen, folglich das Leder um den fünften bis sechsten Theil geschwinder garmachen und daher für die Gerber viel vortheilhafter sind, welche sie, wenn sie nicht gut geraten, ungemein theuer bezahlen müssen. Im Jahre 1870 mussten sie für den Kübel oder 2 Pressburger Metzen, 17 Gulden geben, da sie sie in guten Jahren für eben soviel Groschen haben können« .... Auch die Färber ziehen sie den Galläpfeln vor«[2]).

Il semble donc à recommander de donner à un insecte si utile une demeure fixe en distribuant régulièrement dans les massifs de chêne pédonculé un nombre suffisant de *Q. cerris*. Ceci ne serait peut être pas sans importance pour l'Autriche et les pays voisins, et même en Allemagne et dans les Pays-Bas il y a quelque apparence que cette mesure aurait de bons résultats. En effet, des analyses faites au laboratoire de chimie de l'Ecole polytechnique à Delft ont montré que des galles du *Cynips calicis*, récoltées au mois de janvier en Hollande, sur le sol, et qui avaient donc été exposées déjà trois mois durant à toutes les intempéries du climat, renfermaient encore 20% d'acide gallique. Des galles autrichiennes, envoyées de Vienne, en renfermaient 25%, ce qui représente des teneurs rendables au point de vue technique. Le *Q. cerris* croit très bien en Hollande, surtout dans un endroit abrité et sur un sol frais; cependant il se développe même encore assez bien sur un sol très ingrat. Le bois est dur et se conserve bien; l'écorce fournit de bons matériaux pour le tannage; les glands sont gros et comestibles, ressemblant à des châtaignes; enfin l'arbre adulte est beau et décoratif, de sorte que la culture mérite d'en être recommandée à des points de vue très divers.

L'hétéroecie des *Cynips calicis* et *Andricus cerri* est encore intéressante à un point de vue théorique, par ce qu'elle montre de combien peu d'importance physiologique est le fait étonnant, que bien des espèces de galles sont liées à une seule espèce végétale. Ceci repose bien plutôt sur des instincts ou des circonstances d'ordre externe, causées par l'organisation de la guêpe gallicole, et à un moindre degré seulement sur des propriétés internes de la substance vivante. Cela concorde d'ailleurs avec les résultats d'expériences directes. C'est ainsi que je pus forcer le *Rhodites rosae* à déposer ses oeufs dans les bourgeons des *Rosa rugosa* et *Rosa acicularis*, tandis qu'il ne visite volontairement que les *Rosa canina* et *Rosa rubiginosa*. J'obtins ainsi des bédéguars très beaux et caractéristiques, renfermant des insectes capables de reproduction. Ce changement d'hôte doit également se produire de temps en

---

[1]) *Berliner Gesellsch. Naturf. Freunde*, Bd. 4. p. 1. 1883.

[2]) Il dit encore: »Die Knoppern sind keiner Eiche besonders, sondern man findet sie an der gemeinen Eiche und an der Cerr-eiche (*Quercus cerris L*)«. Metzger (*Landwirthsch. Pflanzenkunde*, p. 358, 1841) dit également que les galles du *Cynips calicis* (Knoppern) se trouvent sur le cerris. L'une et l'autre donnée ne sont pas d'accord avec la réalité. Il n'est guère étonnant que Metzger se soit trompé, car il désigne la guêpe sous le nom de *Cynips quercus pedunculi*, et montre encore ailleurs qu'il ne connaissait pas les galles du chêne. Mais on peut être surpris qu'un forestier tel que Burgsdorff ait pu commettre pareille erreur.

temps dans la nature, ce que je déduis du fait que, près de Renkum, une plantation de *Rosa pimpinellifolia* portait des centaines de bédéguars, alors que jamais, en dépit d'expériences prolongées des années durant, je ne pus provoquer sur cette espèce la production de ces galles. Il en est de même du *Rhodites mayri,* que je ne pus forcer à former des galles sur la *Rosa pimpinellifolia,* malgré que les bédéguars du mayri fussent généralement répandus jadis, dans les dunes hollandaises, sur cette espèce de rosier [1]). Ne faut-il pas du reste invoquer pareil changement brusque d'instinct pour expliquer, chez les ancêtres de la guèpe du calicis, l'hétéroecie de *l'Andricus cerri?* Il y a beaucoup de Cynipides et d'autres animaux gallicoles qui sont moins délicats dans le choix de leur hôte. On se trouve conduit à penser que le cercle des espèces végétales capables de produire une galle identique est bien plus restreint, il est vrai, que le nombre des espèces capables de croisement mutuel; mais l'explication de ce fait ne réside très probablement pas dans des circonstances d'ordre physiologique, mais de nature purement externe. Si l'on jette un coup d'oeil sur le domaine entier des excroissances pathologiques, on verra, je crois, qu'il y a certaine concordance entre l'étendue de groupes végétaux dans les limites desquels l'hybridisation est possible, et l'étendue des groupes susceptibles de porter les mêmes galles. Cependant, on pourra attendre de meilleurs résultats d'expériences dans ce sens des espèces de *Rhodites* et d'*Aulax* que des Cynipides du chêne. Les instincts de ces dernières sont très fixes. L'hétéroecie des deux générations de *Cynips calicis* n'en devient que plus remarquable.

Il y a bien des points encore que j'aurai à relever tout à l'heure. Entre autres la grande importance, insuffisamment appréciée jusqu'ici, des galles de Cynipides en général pour la théorie aujourd'hui dominante du développement. La galle du calicis en particulier, si parfaitement organisée, ainsi que les formes voisines, ont à ce point de vue une haute signification. En effet, les »propriétés spécifiques« constantes et la différenciation très grande des tissus de ces cécidies n'engagent pas moins à entreprendre leur étude sous ce rapport que leurs admirables adaptations; adaptations créées, non pour répondre aux besoins de la plante nourricière, sur laquelle les galles de développent comme des »organes« spéciaux, — mais aux besoins d'un animal étranger, indifférent ou même nuisible à la plante.

Les faits amenés au jour par ce chapitre de la science sont entièrement opposés aux idées aujourd'hui les mieux appuyées, et cependant étroites, sur le développement organique. Les faits dont je parle consistent en ce que la forme est déterminée par des substances liquides, qui circulent librement à travers des groupes considérables de cellules des tissus en voie d'accroissement. Je suis cependant si parfaitement convaincu de l'antithèse de ce résultat avec les vues régnantes que je ne m'attends guère à de grands résultats de ces quelques lignes. Je sais trop que, dans les sciences biologiques, la puissance de conviction d'une loi quelconque n'est pas uniquement déterminée par son incontestable exactitude, mais de plus par son harmonie plus ou moins grande avec les idées théoriques régnantes.

---

[1]) Le *Rosa pimpinellifolia* est devenu beaucoup plus rare dans nos dunes depuis que celles-ci sont drainées pour les besoins de la distribution des eaux. On ne trouve plus aujourd'hui qu'isolément le *Rhodites mayri* dans les dunes, sur le *Rosa rubiginosa.*

1. La guêpe du calicis et sa galle.

La galle du calicis est à bien des points de vue organisée comme un gland avec sa cupule. Elle se compose d'une cupule ligneuse, que je nommerai »cupule de la galle«, sur le fond de laquelle est fixée la »galle interne« correspondant au gland lui même.

La galle entière, par son insertion, correspond au gland proprement dit. Comme celui-ci, elle est ordinairement fixée par une large base sur le fond de la cupule (Pl. II, fig. 10), et rarement sur le gland lui-même. Des exemples de ce dernier cas sont représentés Pl. I, fig. 14, Pl. II, fig. 8; et il peut arriver alors que la galle fasse complètement saillie de la cupule. Souvent je trouvai de deux à cinq, exceptionnellement même huit galles, entourant un gland, et fixées dans la même cupule. Le gland reste dans ces cas de petit volume il est vrai, mais se développe du reste normalement et germe bien. J'ai trouvé de pareils glands nains qui n'avaient atteint que 2 à 3 mm. de longueur, et s'étaient cependant solidement enracinés, bien qu'ils fussent environnés de six galles du *Cynips calicis*.

A l'époque de la maturité propre, qui coïncide avec celle des fruits et tombe au mois d'octobre, la galle ne se détache pas de la cupule. Le gland lui-même aussi est empêché de tomber par la galle adjacente, et l'on trouve en hiver les galles sur le sol, adhérentes encore aux longs pédoncules. Dans le cours de l'automne de l'année suivante, la cupule est complètement décomposée, de manière que les galles du calicis peuvent se rencontrer alors complètement libres, sur le sol. Ce fait est digne de remarque en ce que presque la moitié ou le tiers des guêpes du calicis ne prennent pas leur volée au printemps de la première année, mais que leurs galles restent sur le sol tout l'été et encore un hiver entier durant, sans protection de la part de la cupule du gland. Or, la portion de la surface qui dans le cours du développement est en contact avec le gland constitue son point vulnérable, en quelque sorte son tendon d'Achille. C'est ce que savent très bien nombre d'oiseaux, qui trouvent moyen de parvenir de ce côté à la galle interne. La paroi en ce point est trop mince pour résister au bec, et la larve est perdue.

Il convient d'ailleurs de remarquer que la galle du calicis est parfaitement protégée contre les ennemis ordinaires du monde des insectes. En examinant, sur la coupe, quelques milliers d'échantillons recueillis dans les stations hollandaises, je ne vis que dans un seul d'entre eux, au lieu de la galle interne, les chambres rayonnées du commensal *Synergus reinhardi*, tandis que tous les autres complètement normaux et ne renfermaient pas davantage de parasites. Ce fait est surprenant en ce que les commensaux ordinaires, que Mayr cite comme indigènes en Autriche[1]), notamment les *Synergus melanopus*, *S. pallicornis*, *S. vulgaris* et *S. evanescens*, ne manquent pas dans d'autres galles hollandaises. Tous ces animaux habitent d'ailleurs, en Autriche, la cupule de la galle du *Cynips calicis*, et ne gênent en rien le développement normal de la larve. Seul le *Synergus reinhardi* fait exception, en ce que les chambres larvaires sont situées dans le tissu nourricier même de la galle et en chassent le propriétaire légitime. Les envahisseurs ne sont d'ailleurs guère dangereux même au

[1]) E. G. Mayr. Die Einmiethler der mitteleuropäischen Eichengallen. *Abhandl. Zool. Bot. Ges. in Wien*, Bd. 22, p. 692, 1872.

centre de leur aire de dispersion géographique. C'est ce que je déduis de l'étude de plus de cent galles du calicis, que M. Heibroek à Hilversum eut l'amabilité de me faire envoyer de Vienne dans l'été de 1895. Plusieurs de ces galles m'ont donné il est vrai de nombreuses Synergides, mais les habitants légitimes n'avaient cependant nullement souffert. Deux parasites, que je remarquai au milieu des commensaux, durent être rapportés à ces derniers eux-mêmes. En févier et mars 1896 il est sorti de ces galles une soixantaine de guêpes du calicis, et je soupçonne que les autres galles avaient déjà été abandonnées au printemps par leur habitant légitime [1]).

Les moyens de défense de la galle du *Cynips calicis*, outre celui fourni par le gland, me semblent être les suivantes. D'abord, la paroi épaisse de la cupule, formée au début d'un parenchyme dense, lignifiée plus tard, qui protège suffisamment contre les insectes à courte tarière et contre le bec de petits oiseaux. En second lieu, la forte teneur en tannin qui, suivant divers analytes, varie entre 20 et 50% du poids sec et protège parfaitement contre les limaces, les rongeurs et les oiseaux, pendant la longue période que les galles mettent à mûrir. Peut-être même le tannin protège-t-il aussi contre les champignons parasites et à coup sûr contre les bactéries, ce qui doit être d'une grande importance pour les galles qui passent l'hiver sur le sol. En troisième lieu, la sécrétion colossale de mucilage, qui a lieu durant la période d'accroissement tout entière à la surface de la cupule de la galle, et rend cette cupule ainsi que le gland humides et glutineux. Ce mucilage constitue sans le moindre doute un moyen de protection très efficace contre les petits ennemis ailés. Enfin, une couche de cire protège temporairement les galles tombées contre l'humidité.

Ce n'est pas toutefois dans ce cas isolé que nous rencontrons chez une galle une série de moyens de protection très complets, ressemblant à ceux des plantes et des animaux eux-mêmes. Chez les galles en général, les moyens de protection sont aussi nombreux et aussi parfaitement développés que ceux qui chez les fleurs, les feuilles, les organes en général, écartent les intrus et les ennemis. Ceci constitue un problème physiologique très important. N'est-il donc pas remarquable que les nombreux ouvrages qui traitent du principe de la sélection ne s'en occupent que passagèrement ou pas du tout? Et cependant, il doit être évident à première vue qu'ici aussi ce sont »les conditions vitales qui ont manié le ciseau« et donné naissance aux formes existantes. Comment les conditions vitales ont-elles pu s'y prendre? Il est clair que c'est seulement au moyen de corps liquides, ce qui démontre qu'outre le protoplasme attaché à la cellule, ne la quittant jamais, il y a encore un autre principe qui détermine la forme au cours de l'accroissement, principe capable de se mouvoir librement de cellule en cellule, en traversant les tissus en voie de croissance. Le premier pas à faire par la théorie de la formation des espèces ainsi que par la théorie du développement en général, ce sera précisément de tenir compte de ces choses. Mais l'heure ne paraît pas encore être arrivée.

---

[1]) L'orifice de sortie n'est pas toujours visible, et je préférais ne pas ouvrir les galles, car les échantillons sont de grande valeur et pourront servir à constater si, dans leur patrie, les guêpes quittent encore la galle au bout de trois ans, ce qui n'est peut-être pas le cas en Hollande. Toutes les galles se ressemblent tellement qu'elles ont dû, j'en suis persuadé, tomber de l'arbre en octobre 1894. S'il y en avait parmi elles de 1893, la couleur et l'état de décomposition devraient aisément les faire découvrir.

Si l'on a considéré de près la lutte pour l'existence que doivent soutenir les animaux gallicoles, on comprend que des moyens de défense compliqués, parfois admirables, étaient indispensables. Une armée de parasites menace continuellement presque chaque larve de Cynipide, une armée de commensaux les tissus nourriciers destinés à la larve et engendrés par elle. Je me permettrai de citer une couple d'exemples.

En 1876, le *Dryophanta divisa* était si commun aux environs d'Utrecht, que je pus sans difficulté en recueillir des milliers. Cependant je n'obtins en octobre et novembre qu'une couple d'habitants légitimes; au contraire, à la même époque ainsi que plus tard, des milliers de parasites et commensaux. Cette galle appartient aux formes peu protégées, la protection consistant simplement en un parenchyme à parois épaisses, qui ne se développe que tardivement. Toutefois les galles mieux protégées sont également extrêmement menacées. Il est difficile d'obtenir la guêpe gallicole de l'*Aphilotrix solitaria,* qui dans son jeune âge est protégée par un revêtement laineux très doux, et à la maturité par une enveloppe ligneuse résistante. La galle de l'*Aphilotrix glandulae* est protégée, non seulement par du tissu à parois épaisses et un revêtement pileux, mais de plus par ce que la chambre larvaire n'est pas située au centre de la galle pyriforme. Elle occupe au contraire une position excentrique, et trompe le dard du parasite [1]). Cette galle se range donc en somme au nombre des formes très bien protégées. Elle était assez généralement répandue, en 1883, sur les chênes aux environs de de Grebbe en Gueldre. Je n'ai pu toutefois obtenir de guêpes d'aucune des galles, mais uniquement des parasites, et dans les années qui suivirent la galle a complètement disparu de de Grebbe. Il n'est pas certain qu'elle existe encore actuellement dans les Pays-Bas. Je pourrais fournir de nombreux exemples analogues, qui concourent tous à rendre explicable la différenciation vraiment étonnante des galles de Cynipides, quand on invoque le principe de la sélection. Si les galles n'etaint que des organes végétaux ordinaires, les cas innombrables d'adaption se trouverraient augmentés d'un exemple nouveau. Mais combien l'intérêt qui s'y attache augmente, quand on songe que la sélection naturelle ne peut agir ici indubitablement que grâce à la variation de substances en circulation. Ces substances se répandent uniformément sur des centaines de cellules, et les obligent à développer une activité ontogénétique commune. On voit ainsi clairement que la nouvelle théorie de la pangénèse, ainsi que la doctrine du plasma germinatif qui en est issue, ne tiennent compte, dans les limites de leur vérité, que de la moitié du problème du développement. Mais revenons pour le moment aux galles du calicis.

La femelle pond ses oeufs vers le milieu du mois de mai. Les premiers stades du développement de la galle du calicis peuvent donc se rencontrer en juin. En septembre, les galles sont adultes, mais cependant encore complètement fraîches et vertes, et ne renferment encore à ce moment qu'une larve très-petite, au sein d'un

[1]) Cette particularité n'est pas rare chez les galles de Cynipides. Je rappellerai p. ex. la galle bien connue du curvator. Elle est toutefois le plus remarquablement développée chez la galle du *Dryophanta disticha* sur le *Quercus sessiliflora,* où la chambre larvaire proprement dite est excentrique, et située tout près du hile de la galle. Au centre, à l'endroit donc où chez d'autres galles, entièrement semblables au dehors, se trouve la chambre larvaire, il y a un espace vide, chambre pseudo-larvaire, où les ennemis déposent leurs œufs par erreur. Il y a chez l'inflator une disposition semblable.

tissu nourricier abondant, gorgé d'amidon. Si l'on récolte des galles avant [illegible] qu'on les conserve desséchées, le développement entier peut s'y faire régulièrement. Mais la guêpe que l'on obtient est d'autant plus petite que l'on a recueilli la galle à une époque plus reculée de son développement, et elle peut atteindre une valeur minima, correspondant environ à la mi-longueur de l'insecte normal. Comme le tissu nourricier primaire est déjà entièrement développé très tôt, on peut obtenir des guêpes même de galles très petites, recueillies en juillet, ce qui témoigne d'un pouvoir de résistance très considérable de l'habitant. Ceci résulte d'ailleurs encore des propriétés de la guêpe adulte. Enfermée à l'état de complet développement dans la galle interne, la guêpe peut être conservée dans une chambre chauffée et sous une couche de neige, sans montrer à la sortie, en février ou mars, beaucoup de traces de ces traitements divers. La seule différence, c'est que les guêpes conservées en chambre prennent leur vol une ou deux semaines plus tôt. Par suite d'une erreur, une boîte de verre, dans laquelle je conservai pendant l'hiver très doux de 1895—96, environ deux cent galles internes, récoltées en janvier 1895 sur le sol, s'était remplie d'eau. Lorsque je m'en aperçus en février 1896, les galles internes avaient déjà flotté sur l'eau pendant des mois entiers, mais n'avaient cependant pas coulé à fond, et les guêpes en sont plus tard très régulièrement sorties. Dès qu'elle est en liberté, la guêpe ne vit pas longtemps d'ordinaire. Tout au moins la plupart des guêpes étaient elles, dans mes nombreuses expériences de culture, mortes au bout d'une quinzaine de jours dans mes filets de gaze, et ceci malgré que l'eau ne leur avait pas fait défaut. Les galles envoyées de Vienne et dont il a été question cidessus fournirent des résultats quelque peu différents. Ces galles furent conservées dans un flacon de verre bouché. Quand j'entrepris en février et mars 1896 des expériences avec les guêpes en train de sortir, celles-ci se comportèrent normalement dans les filets. Les guêpes conservées en même temps que les galles dans les flacons demeurèrent au contraire bien plus longtemps en vie, et je pus donc dans le cours de la même année assister au rare spectacle de posséder encore le 4 avril quelques guêpes vivantes du calicis, qui étaient sorties vers la fin de février.

J'ai dit plus haut que la galle du calicis ressemble à un gland dans sa cupule. Ceci est surtout évident pour les jeunes galles au stade de juin (Pl. I, fig. 12), tandis que chez les galles arrivées à maturité les tissus se déchirent toujours plus ou moins, ce qui rend un peu moins distincte la composition des galles de deux parties indépendantes. Ceci provient de ce que la surface externe de la galle proprement dite, complètement libre à l'origine, se soude dans le cours ultérieur du développement avec la partie interne de la cupule de la galle, et ne redevient libre qu'à la dessiccation. Cela ne se peut toutefois sans que les couches internes de la cupule se déchirent irrégulièrement, de sorte que la galle interne mûre, fixée au fond de la cupule, est d'ordinaire environnée d'une enveloppe en forme de sac.

Je n'ai pu jusqu'ici déterminer avec certitude la valeur morphologique de la cupule der la galle. Voici cependant ce qui me paraît pouvoir être prétendu avec certitude. La cupule de la galle ne peut être comparée à la cupule garnie de feuilles de la galle du gemmae, mais il y a bien des indices que la »couronne« caractéristique que l'on trouve si élégamment développée chez la galle de l'argentea, à l'état rudimentaire chez celle du tinctoria et chez quelques exemplaires du kollari, doit être considérée comme homologue de la cupule.

Si cette supposition est exacte, les métamorphoses phylogéniques qui ont eu lieu dans les galles du seul sous-genre Cynips, sont aussi profondes que celles qui séparent les fleurs hypogynes des fleurs épigynes, et la forme du réceptacle dans les deux cas rend la comparaison très exacte. A partir du moment où la larve est adulte, la paroi de la galle interne mûre ne se compose que d'un tissu de cellules ligneuses. La galle interne elle même possède une forme irrégulièrement ellipsoïdale, et le sommet organique, c'est à dire l'endroit de la chambre où le méristème de la galle s'est fermé en dernier lieu lors de l'emprisonnement de l'embryon, se présente sous la forme d'une saillie conique [1]).

Quand j'eus extrait en janvier 1893 environ cinq cent galles internes, et que je les conservai dans des boîtes en verre sur du papier à filtrer humide dans une cave fraîche, il en sortit dans la première moitié de mars 1894 environ 320 individus de la guêpe du calicis. Les autres furent tenus en réserve, car ils renfermaient encore tous des larves fraîches. Celles-ci se transformèrent pour la plupart en nymphes vers la fin de juillet 1894, et en guêpes au mois de septembre. Ces guêpes sont sorties au mois de mars 1895. Cependant 46 galles sont encore en ce moment demeurées closes, et furent ouvertes le 6 avril 1896. Une seule d'entre elles renfermait encore une larve, quatre des guêpes vivantes et développées, mais très débiles, à peine sorties de la nymphe et évidemment destinées à périr. Dans toutes les autres galles il y avait des guêpes du calicis mortes et couvertes de moisissures. La proportion réelle entre guêpes annuelles et bisannuelles n'est pas ainsi déterminée avec certitude, car parmi les 320 exemplaires sortis en mars 1894 il y avait déjà peut être des insectes âgés de deux ans. Les galles avaient été en effet recueillies sur le sol sans faire attention à cette différence, et [2]) seuls des exemplaires récoltés sur les arbres peuvent fournir ici toute la clarté voulue. Ce qui toutefois est déjà rendu très improbable par cette expérience, c'est qu'outre des guêpes d'un et de deux ans, il y en ait encore qui parcourent une période de repos larvaire de plusieurs années. En effet, des galles plus âgées se reconnaîtraient déjà à leur état de décomposition. Je n'ai pu découvrir de différences externes entre les guêpes du calicis de la première et de la deuxième année.

Ma récolte de galles du calicis de janvier 1895 me conduit encore aux remarques suivantes.

Le trou de sortie est pratiqué latéralement dans la paroi de la galle interne, et bien des guêpes sont donc obligées de percer de plus la cupule ligneuse. Mais dans beaucoup d'échantillons la cavité interne est creusée de telle manière que l'animal pénètre d'abord dans la large chambre de la cupule, où il peut attendre tranquillement une belle journée pour prendre son vol. La guêpe peut alors, sortir de sa prison, profiter de l'orifice naturel de la cupule, sauf à élargir légèrement cet orifice au besoin. Quand je dirigeai spécialement mon attention sur ce point en février 1895, je trouvai en effet que beaucoup de guêpes sortaient de la galle par ce moyen, plus ingénieux que leur pratique ordinaire.

Je ferai encore remarquer ce qui suit. De nombreux exemplaires de ma récolte sont sortis vers la fin février 1896, c'est à dire après un repos de deux années. Beau-

[1]) Dans mes figures 12 et 13 Pl. I, il y a par erreur en cet endroit une dépression.
[2]) L'erreur dans les figures, indiquée dans la note précédente a été corrigée.

coup de galles au contraire, récoltées en octobre 1895, n'ont fourni de guêpes qu'au commencement de mars 1896. Je crois donc que la génération de deux ans prend son vol plusieurs jours avant la génération annuelle. Toutefois, je considère ce point comme n'étant pas complètement hors de doute [1]).

2. Pourquoi je cherchai la deuxième génération du Cynips calicis sur le Quercus cerris.

Quand Burgsdorff montra en 1783 [2]) que les galles du calicis sont habitées par un insecte, qui fut dénommé en 1840 par Th. Hartig [3]), il donna en même temps une figure d'une guêpe enfonçant sa tarière dans un jeune gland de *Quercus pedunculata*. Lorsqu'à mon tour je remarquai en 1885 que la guêpe du calicis sort de la galle en février et mars, à une époque où pas un bourgeon de chêne n'est déjà ouvert, je crus devoir contrôler l'assertion de Burgsdorff. On ne peut, en effet, admettre que l'insecte prenne son vol en février pour ne déposer ses oeufs qu'en mai; il ne vit en liberté qu'un temps très court. J'eus bientôt la certitude que la figure de l'auteur n'était qu'une représentation de fantasie, et je supposai donc que la guêpe est capable de pénétrer jusqu'au jeune gland dans le bourgeon. Mais l'examen microscopique m'apprit bientôt que ceci non plus n'était pas possible, pour la simple raison que l'oeuf doit nécessairement être déposé entre le jeune gland et la cupule, et que ces parties ne sont pas encore différenciées au commencement de mars, quand la guêpe prend sa volée. Le tout est encore à l'état d'un seul point végétatif méristématique.

Je me vis donc forcé de conclure que la guêpe dépose son oeuf ailleurs et que je me trouvais en présence du premier exemple de génération alternante chez une espèce de *Cynips*, dans le sens restreint donné récemment par M. Mayr à ce nom générique [4]). Il y avait donc à découvrir ici un nouvel insecte et une nouvelle galle, ou bien des formes déja connues devaient être rapportées à la deuxième génération probable.

Ce n'est qu'après de très nombreuses expériences, réparties sur de longues années, que je suis parvenu à réaliser mes espérances et à cultiver la nouvelle galle. Cette galle m'a ménagé en outre, comme nous l'avons vu, la surprise plus grande encore de croître sur un hôte différent.

Le fait que mes expériences ont été si longtemps infructueuses tient à ce que, d'accord en ceci avec tous les résultats antérieurement acquis, je crus devoir chercher la deuxième génération, de même que le *Cynips calicis* lui-même, sur le *Quercus*

[1]) Ceux qui s'intéressant aux procédés de récolte et au commerce de notre galle trouveront des renseignements dans Eitner, Die Nutzung der Knopper (dans *Der Gerber*, Jahrg. 13, p. 77, 91, 1887, et Jahrg. 15, p. 277, 1889).

[2]) *Schriften der Berl. Ges. Naturf. Freunde*, Bd. 4, p. 1, 1783.

[3]) *Germar's Zeitschr. f. Entomologie*, Bd. 2, p. 187, 1840.

[4]) Die Genera der Gallenbewohnenden Cynipiden. Zwanzigster Jahresber. der Realschule, Wien, 1881.

pedunculata. J'essayai donc de faire attaquer les bourgeons de ce chêne par la guêpe; mais ceci n'eut lieu que rarement, et évidemment avec la plus grande répugnance. Jamais d'ailleurs il 'n'en résulta une galle quelconque. Aussi me vis-je conduit de plus en plus à conclure que l'histoire de la guêpe du calicis devait renfermer un épisode complètement inattendu. Quand, préparé par ces réflexions, j'étudiai à diverses reprises les stations hollandaises du *Cynips calicis*, je fus finalement frappé du fait que le *Quercus cerris*, qui d'ailleurs est rare dans nos plantations, se trouve en beaux exemplaires dans ces stations mêmes. Se pourrait- il que ce chêne fût l'hôte de la deuxième génération? Et les galles du calicis ne seraient-elles si fréquentes en Autriche, dans la Hongrie, l'Esclavonie, la Croatie, etc., que parce que les forêts y renferment le *Quercus cerris*, tandis qu'en Allemagne, où cette essence fait défaut, le *Cynips calicis* ne se rencontre également qu'à l'état tout à fait sporadique, tout comme dans les Pays Bas? L'hypothèse n'était pas fort probable, car le fait de dépendre de deux galles est pour un insecte déjà un indice de haute complication biologique; et combien cette complication devient plus forte encore, quand ces deux galles sont réparties sur deux arbres différents! Cependant cette hypothèse servit de point de départ à une expérience, et les résultats en démontrèrent l'exactitude. Mais avant que les nombreuses cultures eussent tranché la question, ce qui eut lieu en mars, avril et mai des années 1894, 95 et 96, nombre de circonstances m'avaient déjà si fermement con vaincu de la vérité de mon hypothèse, que je crus à la possibilité de trouver sur et sous les chênes de Bourgogne les galles desséchées encore inconnues des années précédentes. Je me laissai guider par la réflexion, que la galle cherchée devait être très petite, et ne se rencontrerait probablement que sur les étamines; car seules les étamines, me semblait-il, permettraient une croissance et une maturation aussi rapides que le réclame la deuxième génération du *C. calicis*. En effet, les premiers stades de développement de la galle du calicis avaient déjà été trouvés au commencement de juin, et la croissance de cette galle est lente. Ces diverses suppositions se sont montré complètement exactes après de nombreuses variations d'opinion, provoquées par les difficultés des expériences de culture. Je trouvai au pied des chênes, adhérentes aux restes desséchés et d' aspect assez peu attrayant des châtons des précédentes années, les enveloppes des galles cherchées. Ce qui me facilita le travail, c'est qu'en Hollande ces arbres ne portent plus qu'une seule autre galle. C'est ainsi que s'établit mon opinion que la guêpe du calicis ne profite pas, comme le dit Burgsdorff, du *Quercus pedunculata* pour déposer en mai ses oeufs dans les jeunes glands, mais qu'elle choisit à cet effet, au commencement de mars, les boutons floraux mâles encore complètement fermés du *Quercus cerris* pour mourrir quelques jours après.

3. Ponte chez le Cynips calicis.

Mes expériences furent faites à Delft. Je fis usage de guêpes provenant de galles récoltées en janvier, et ouvertes à l'endroit même pour emporter les galles internes seules. Quelques centaines de ces galles furent déposées sur du papier à filtrer humide dans des boites de verre, et conservées dans la cave ou dans le jardin sous

une couche de neige. La guêpe du calicis commença à sortir de la galle vers la fin de février et au début de mars; les derniers retardataires ne firent leur apparition que dans la première moitié d'avril. Il a été d'une grande importance pour mes expériences que les insectes se trouvèrent à ma disposition pendant un si long laps de temps.

J'avais apporté de Rheden des branches en fleurs de *Quercus cerris;* on m'avait d'autre part obligeamment envoyé des matériaux du jardin botanique de Leyde et de Hilversum, et j'avais reçu de robustes branches d'un arboriculteur de Zwolle ainsi que des promenades publiques de Delft. Tous ces matériaux appartiennent à deux variétés bien caractérisées [1]; cependant la guêpe ne fait entre elles aucune différence, et la deuxième génération se développe sur l'une et sur l'autre avec des propriétés identiques.

Les branches furent mises dans des cuves de pierre remplies d'eau, et enveloppées dans de la mousseline transparente pour recueillir les guêpes. Les cuves se trouvaient, les unes dans une chambre non chauffée, les autres à l'air libre. La ponte put être observée dans nombre de cas (fig 1, Pl. I); elle n'a lieu que sur les fleurs mâles. Comme les bourgeons chez le *Q. cerris* sont assez petits, les animaux qui y ont enfoncé leur tarière ne sont que très légèrement fixés au bourgeon. Il est donc difficile de les tuer en même temps que le bourgeon, sans qu'ils retirent leur tarière. Cependant j'y ai réussi à diverses reprises, en laissant tomber des rameaux prudemment coupés dans l'éther. L'alcool laisse toujours à la guêpe le temps de retirer sa tarière. On voit fig. 1 l'image d'une guêpe en train de pondre sur un bourgeon de *Q. cerris;* la figure a été faite d'après une photographie.

Les guêpes peuvent être longtemps occupées sur un même, bourgeon et y déposer beaucoup d'oeufs; ou bien elles abandonnent le bourgeon après y avoir pondu un ou deux oeufs. Dans le premier cas, l'inflorescence mâle est plus ou moins complètement transformée en galles, réunies en glomérule. Quelquefois on trouve jusque 10 et 12 galles l'une près de l'autre (fig. 7), tandis que d'autre part on peut ne rencontrer en mai, sur une inflorescence entière, qu'une ou deux galles. Les autres modifications que l'on observe sur les inflorescences où des oeufs ont été déposés sont de peu d'importance. Les galles, de trés petite taille, sont entièrement ou du moins en majeure partie enfoncées dans le périanthe; et il est souvent difficile de les trouver, même à leur état de maturité complète, quand elles ne sont pas réunies en groupe. Mais il est bien plus difficile encore d'observer de jeunes états de développement; et l'on est donc obligé de déduire l'embryogénie de cette galle des processus chez des formes parentes plus communes. Il faut ranger ici surtout, parmi les espèces hollandaises, la galle de *l'Andricus nudus* sur le *Quercus pedunculata* [2]).

La découverte des oeufs du calicis présente aussi des difficultés, en dépit de ce que, dans les expériences de culture, la guêpe montre le chemin. En effet, le plissement et le revêtement pileux des feuilles gênent l'observateur. Heureusement les châtons mâles se trouvent à la base des rameaux, et sont donc, dans le bourgeon, directement recouverts par les écailles. On peut donc, en dissociant un bourgeon où

[1]) La forme type et le *Q. cerris* var. *austriaca*; voir Dippel, Laubholzkunde, Bd. I, pag. 95, 1880.

[2]) C'est à coup sûr la galle staminale la plus commune aux environs de La Haye et de Scheveningen, plus commune dans tous les cas que l'*Andricus pilosus*.

des oeufs ont été déposés, laisser en place les feuilles internes; et j'ai pu réellement quelquefois, quand une guêpe du calicis avait quitté son bourgeon, découvrir les oeufs frais pondus entre les étamines.

L'endroit occupé par les oeufs est du moins à très peu près le même que chez le *Neuroterus lenticularis.* L'oeuf n'est pas déposé dans l'anthère destinée à fournir la galle, mais à sa surface; et le long pédicule (*Es* fig. 3) traverse plus ou moins fortuitement le périanthe et le pédoncule floral dans le sens transversal. Cette dernière circonstance fait-que souvent, à l'époque du complet développement de la galle, on peut trouver avec quelque attention des traces de la blessure, sous forme d'une cicatrice subérifiée sur l'axe du châton; ou bien cet axe est, par suite de la lésion, un peu renflé ou recourbé; ou enfin, il n'y a pas de cicatrice du tout.

Comme il a été dit plus haut, le corps de l'oeuf ne fait que se trouver en contact avec l'anthère destinée à donner la galle. J'ai il est vrai observé dans un cas déterminé que l'anthère elle-même était traversée par le pédicule de l'oeuf; mais je me suis assuré que la blessure qui en résulte n'est pour rien dans la production de la galle. Aussi est-il donc certain dans ce cas que l'enveloppement de l'embryon par les tissus méristématiques de la galle se fait de la même manière que chez les autres galles de Cynipides, et que les substances cécidiogènes ne peuvent donc provenir que de l'embryon lui-même.

Les étamines sont déja très complètement développées en mars, c'est à dire à l'époque de la ponte, et l'on ne peut donc s'étonner que la galle mûre laisse encore observer très distinctement la moitié de l'anthère non intéressée dans la production de cette galle (*ant'* fig. 9). Cette portion se voit sous forme d'une dépression latérale au-dessous du sommet. Je ne saurais d'ailleurs en dire davantage à présent de l'embryogénie de cette galle si petite et peu apparente et je dois passer à son examen à l'état de maturité. Mais auparavant, je dois dire quelques mots sur l'histoire de mon étude.

Je croyais devoir conclure de mes expériences instituées en 1895, que des bourgeons végétatifs peuvent être également employés par le *Cynips calicis* pour y déposer ses oeufs, et qu'il en résultait une galle, que dans ma note préliminaire j'ai nommée *Cynips cerri gemmae,* mais que j'ai reconnue plus tard pour celle de *l'Andricus circulans.* En commençant mes expériences, en 1896, je croyais encore à cette hypothèse. Jamais, il est vrai, je n'avais pu démontrer dans les bourgeons végétatifs la présence d'oeufs du calicis, ce qui était possible au contraire dans les châtons mâles. Je croyais toutefois pouvoir attribuer ce fait à la grande difficulté de pareille recherche. Je ne m'étais pas encore aperçu que le *Cynips calicis* ne choisit qu'exclusivement des boutons floraux du *Quercus cerris.* Heureusement, j'avais marqué au cours du printemps de cette année tous les bourgeons renfermant des oeufs, et je découvris en mai que la galle du circulans m'avait tout simplement trompé par sa présence universelle, et le développait tout aussi bien sur les bourgeons marqués et renferment des oeufs que sur les bourgeons non marqués [1]). La galle en question n'avait donc rien à faire avec le *Cynips calicis.* Quant à la galle du cerri, qui est bien plus difficile à cultiver, elle ne prit uniquement naissance que sur les bourgeons où

[1]) Je puis actuellement (février 1897) confirmer pour la seconde fois l'observation ici notée.

avaient été déposés des oeufs du calicis d'après mes observations directes. On s'imagine aisément combien pareilles recherches sont délicates et fatigantes, quand on songe que les filets de gaze ne peuvent demeurer sur les rameaux de *Q. cerris* que pendant la durée d'une observation.

---

4. Description de la galle de l'Andricus cerri[1]).

Comme je l'ai dit plus haut, je connais depuis plusieurs années la galle du cerri ou tout au moins sa capsule sèche. Ce n'est toutefois que dans le printemps de 1896 que j'ai été capable d'observer directement la formation de la galle dans mes cultures au laboratoire. Mes recherches avaient été entreprises dans une chambre non chauffée. Je pus, le 2 mai 1896, prendre une photographie des châtons en train de s'ouvrir, sur les étamines desquels s'étaient formées sous mes yeux quelques galles du cerri. (Pl. II, fig. 13).

Les étamines étaient encore complètement incluses dans le périanthe, et au-dessus de ce dernier faisait saillie la galle. Mais cet état de choses ne dure pas, et à l'état de maturité complète, les galles, brunes et minuscules, sont souvent enfouies plus ou moins profondément dans le périanthe sous la forme de petites éminences coniques; et leur sommet peut même ne pas atteindre le sommet des étamines. Je dois faire remarquer pour cette raison que la figure 7, Pl. I, qui représente notre galle, et de même la fig. 9, où l'on voit la galle grossie, ont été dessinées d'après des matériaux non encore arrivés à maturité complète. La forme et la position sont toutefois très exactement représentées.

J'ai trouvé, en liberté, des galles du cerri complètement mûres vers le 12 mai 1894. Dans le cours d'années antérieures, quand je ne connaissais pas encore la galle vivante, mais bien déjà la guêpe *Andricus cerri*, j'observai la ponte entre le 15 et le 25 mai. Dans le printemps très froid de 1896, la galle était mûre vers la mi-mai, mais la guêpe y est restée jusque vers le 25 mai. Le début de la deuxième moitié de mai doit donc être considéré comme l'époque de la maturité.

La galle du cerri appartient aux galles de Cynipides les plus petites que l'on connaisse jusqu'à présent. Celle de *l'Andricus schlechtendali* seule est plus petite encore. Notre galle atteint une longuer de 1½ à 2 mm. et environ 1 mm. dépaisseur. Comme il a été dit plus haut, elle se caractérise par ce que l'on voit en dessous du sommet la moitié de l'anthère non employée á la formation de la galle, moitié qui ne peut naturellement se distinguer qu'à la loupe et montre nettement la dépression destinée à la déhiscence. On n'y trouve pas de grains de pollen bien dévéloppés. Dans mes figures 7 et 9, Pl. I, ce rudiment de l'anthère est représenté en teinte plus foncée qu'il ne lui revient en réalité, mais l'image en est d'ailleurs fidèle [2]). L'autre moitié de l'anthère a servi plus ou moins complètement à former la galle. On peut

---

[1]) Nommée *Cynips cerri staminum* dans ma note préliminaire.

[2]) La même chose s'observe chez les galles du nudus et du pilosus; on y trouve également sur le chôté, en dessous du sommet de la galle, le vestige d'une moitié d'anthère. L'étendue du groupe cellulaire influencé par l'œuf de Cynipide doit donc être à peu près identique, dans tous ces cas, malgré la grande différence de ces ex-

toutefois la reconnaître encore distinctement dans bien des galles du cerri, où on la voit symétriquement située relativement à la moitié rudimentaire. Une étude attentive montre que le pédicule de l'oeuf du calicis est souvent visible à l'extrémité de la galle, entre les deux anthères, c'est-à-dire à l'endroit même où doit apparaître l'orifice, ou le point où s'est enfin fermé le méristème cécidiogène en enveloppant l'embryon animal. Les deux anthères convergent fortement vers le sommet de la galle, et le connectif ne peut donc avoir contribué que fort peu à son sommet à la formation de l'excroissance. On peut, en effet, reconnaître nettement que seule la moitié inférieure de ce connectif, ainsi que les couches voisines des loges, sont intéressées dans la cécidiogénèse. Bien que les anthères du *Quercus cerris* soient portées par des filets, et que les galles au contraire soient apédiculées, on ne peut dire que les filets contribuent à la formation de la galle du cerri, parce que, à l'époque où commence le développement de la galle, les filets ne sont pas encore formés.

Les galles sont insérées généralement deux par deux, et avec une large base, sur le réceptacle, enveloppées du périanthe. Les autres étamines de la fleur sont normales et laissent échapper leur pollen à l'époque ordinaire, c'est-à-dire à peu près au moment même où la guêpe du cerri prend sa volée, ou bien un peu plus tôt. Le *Quercus pedunculata* a dépassé alors sa période de floraison, et commence précisément à développer ses fruits.

La galle du cerri mûre et sèche se compose d'une paroi mince comme le papier, très fragile et délicate, d'une belle teinte brune, comparable plutôt à une petite coque, verte aussi longtemps que la galle est encore vivante, brune et luisante plus tard. Les cellules de cette coque sont parenchymateuses et à parois épaisses. Les tissus nourriciers et les tissus à amidon ont à peu près la même structure que chez la galle du taschenbergi, mais disparaissent déjà en avril.

L'axe floral et le périanthe sont, comme nous l'avons vu, souvent perforés par la guêpe du calicis, lors de la ponte. Ceci a lieu à une époque où ces parties sont déjà très développées et complètement différenciées intérieurement. Il fallait donc attendre que parfois ces blessures devraient être visibles encore à côté des galles mûres. Ceci s'applique surtout à l'axe floral, qui non seulement présente de petites cicatrices subérifiées aux endroits où il y a des galles, mais qui y est en outre plus ou moins renflé. Il peut en résulter que les châtons portant un grand nombre de galles soient plus ou moins rudimentaires, et demeurent très courts. Aussi, quand je ne connaissais pas encore pour l'avoir vue la galle de l'*Andricus burgundus*, croyais-je sur la foi des descriptions existantes qu'elle pourrait bien être identique à celle du cerri. Mais un coup d'oeil jeté sur la fig. 7, Pl. III, représentant une branche de *Quercus cerris*, provenant de M. Wachtl, et portant des galles de l'*Andricus burgundus* Giraud, montrera nettement que cette hypothèse n'est pas fondée [1]).

---

croissances. Chez le schlechtendali, c'est le connectif qui s'est transformé en galle, laquelle porte donc sur ses deux faces les anthères, restées steriles mais en apparence normales.

[1]) L'incertitude adhérente à la description de la galle de l'*Andricus burgundus* par M. Mayr (Eichengallen, Erste Hälfte, p. 31, 1870) a été dissipée par M. Wachtl,

5. La guêpe de l'Andricus cerri.

La guêpe du cerri (figs. 2 et 8, Pl. III) se distingue difficilement, d'après les descriptions existantes, de l'*Andricus burgundus* Giraud. Lorsque j'appris à connaître l'animal d'après des individus pris à l'époque de la ponte, j'établis la détermination précédente, et M. Mayr à Vienne confirma l'étroite parenté avec cette espèce. La guêpe ressemble à beaucoup d'autres points de vue à la guêpe du circulans (figs. 3 et 4, Pl. III). Cependant une étude approfondie m'a montré qu'elle se distingue en réalité de ces deux espèces et n'a jamais été décrite jusqu'ici.

Elle appartient au genre *Andricus*, lequel ne se distingue du genre *Cynips* que par l'absence de poils. Il y a donc parenté étroite entre ces deux genres.

On s'aperçoit, quand on élève la guêpe d'un grand nombre de galles, qu'il y a des mâles et des femelles, et qu'au début de la période de sortie de la galle, les mâles sont en grande majorité. C'est donc le même phénomène que chez les plantes on nomme protérandrie. Mais ici, chez les guêpes qui éclosent plus tardivement on observe encore le même fait. C'est ainsi qu'un dénombrement me donna, pour 93 mâles, 25 femelles.

L'*Andricus cerri* est un animal extrêmement petit et très délicat. La chaleur de la main sufisait à le tuer au moment de la ponte. La longueur du corps est exactement de 1½ mm.; les mâles mesurent au repos, de l'extrémité de l'antenne à celle de l'aile 4½ mm; les femelles un peu moins [1]). Cependant les deux sexes sont rapides au vol, et surtout le mâle est, pour une Cynipide, très vif. La copulation a lieu aussitôt après la sortie de la galle, et s'observa très souvent dans mes boîtes de verre.

La guêpe du cerri ressemble si fort à l'*Andricus burgundus* que la description des caractères de ce dernier s'applique littéralement à la première. Il me semble donc désirable de faire suivre ici la diagnose orginale de Giraud. Il dit [2]): »*A. burgundus* n.s.«. Niger vix pubescens; antennis fuscis, basi pallidioribus; ore pedibusque fulvo-testaceis, coxis posticis vel omnibus, nigris; capite thoraceque coriaceis, opacis. Ant ♂ 14, ♀ 13 art, Long 1½ mm. Var. Antennis fulvo-testaceis apice obscuro.

Tête et thorax finement coriacés, opaques et presque nus, les flanc aciculés. Ecusson proéminent en arrière, ruguleux, avec deux très petites fossettes à la base. Antennes de la femelle brunes, plus ou moins roussâtres à la base, surtout en dessous. Abdomen luisant, faiblement comprimé sur les côtés, de la largeur du thorax; son premier segment formant environ ¹/₃ de sa longueur. Pattes d'un testacé un peu fauve ou roussâtre, selon les individus avec les hanches postérieures et une partie variable

---

qui étudia à nouveau les types originaux conservés à Paris (*Abh. Zool. Bot. Gesellsch.*, Wien, 1880, p. 544). D'après cet auteur, M. Giraud s'est donc certainement trompé quand il a envoyé à M. Mayr, sous le nom d'*Andricus burgundus*, et pour les figurer dans les »Eichengallen«, des galles de l'*Andricus circulans*. Le fait que même l'auteur qui découvrit la guêpe a pu se tromper montre combien la distinction des formes dans ce groupe est difficile.

[1]) On donne pour le *Neuroterus schlechtendali* 0,9—1,2 mm. de longueur; mais je trouvai des individus encore plus petits.

[2]) Signalements de quelques espèces nouvelles de Cynipides et de leurs galles. *Abhandl. d. Zoöl. Bot. Ges. in Wien*, Bd. 9, p. 350, 1859.

des antérieures, noires. Ailes transparentes, leurs nervures et l'écaille rousse; la cellule radiale étroite, songue, l'aréole très petite.

Dans la variété les antennes sont d'un testacé fauve, avec les derniers articles un peu obscurs. Les pattes sont aussi plus claires et les hanches antérieures sans mélangé de noir [1]).

Le mâle se distingue par la petitesse de son abdomen et par ses antennes qui sont un peu plus longues, d'égale épaisseur partout, submoniliformes; leur troisième article est un peu aminci à la base, ce qui le fait paraître comme échancré. La couleur de ces organes est ordinairement comme dans la variété« [2]).

La description de la galle est donnée dans les termes suivants:

»Les galles de cette espèce se trouvent, au printemps, sur *Quercus cerris,* connu aussi sous le nom vulgaire de chêne de Bourgogne, mais elles sont très rares. Elles sont quelquefois réunies au nombre de 10—15 sur un bourgeon dont il ne reste plus que quelques écailles. Chaque galle consiste en une petite coque dure, de couleur rousse claire, de forme ovoïde tantôt un peu allongée tantôt plus courte, à peu près du volume d'un grain de millet. Dans quelques cas j'ai observé une seule galle siégeant à la base du pédoncule des fleurs. Il me parait que les étamines sont le siège primitif de cette espèce, et la réunion d'un grand nombre de galles en un seul point me semble provenir de la transformation de ces organes à une époque où ils étaient encore renfermés dans le bourgeon. La sortie de l'insecte a lieu de bonne heure; le 16 mai, j'ai observé plusieurs galles déjà abandonnées; celles qui étaient encore entières m'ont fourni, les jours suivants, 25 individus parmi lesquells il ne se trouvait que deux mâles.«

Je dois à M. le professeur Wachtl d'avoir pu examiner 2 individus mâles et 2 femelles de la guêpe du burgundus, pris prés de Mariabrunn, ainsi que leurs galles. On voit, à ce qu'il me semble, distinctement que ce sont les châtons mâles qui portent les galles (fig. 7, Pl. III). Mais celles-ci sont si serrées les unes contre les autres, l'axe est reste si court, que l'on ne voit plus rien des fleurs libres. Chez une galle du cerri l'agglomération est, il est vrai, souvent tout aussi forte (partie supérieure de γ fig. 9, Pl. I), mais il en résulte cependant une autre image que dans le cas du burgundus, parce que la galle du cerri est plus petite. Dans d'autres cas, très probablement les plus nombreux, les galles du cerri sont bien moins serrées, ce qu'on voit figuré dans la partie inférieure du châton de la fig. 7, Pl. I. Alors la ressemblance avec le burgundus fait complètement defaut.

Mais il y a quelque chose de bien plus important que la différence des galles entre elles; c'est la différence de forme des oeufs de l'*Andricus cerri* et de l'*Andricus burgundus.* L'étude au microscope a montré en effet que chez la première guêpe la forme de l'oeuf (fig. 4, Pl. I) est la normale, c'est-à-dire que le pédicule est inséré

[1]) J'ai déjà dit plus haut qu'il ne faut pas attacher trop grande valeur à la description des couleurs de ces objets si menus. En effet, la teinte s'éclaircit à la dessiccation. Dans l'alcool, la décoloration est encore plus prononcée, de telle sorte que les guêpes du calicis y deviennent jaunes au bout de quelques années, la nervation des ailes étant entièrement incolore.

[2]) On consultera, pour la diagnose la plus récente de cette guêpe: Mayr, Die Arten der gallenerzeugenden europäischen Cynipiden, pag. 17, Sep. abdr. du 20ster *Jahresber. d. Oberrealschule in Wien.* Vienne, Hölder, 1882.

au pôle de l'oeuf, dans le prolongement de celui-ci, par consequent de la même manière que chez la forme mère *Cynips calicis* (fig. 3, Pl. I). Voici au contraire l'état des choses chez la guêpe du burgundus, recueillie par M. Wachtl. L'oeuf possède une forme extactement intermédiaire entre celle de l'*A. cerri* et de l'*A. circulans*, représantée aux figs. 5 et 6. Pl. I. Or, l'oeuf du circulans est caractérisé par ce que le pédicule n'est pas inséré au pôle, mais latéralement, au-dessous du sommet de l'oeuf. Ce pédicule forme à peu près un angle droit avec l'axe longitudinal de ce dernier. Quand je dis que l'oeuf du burgundus présente une forme intermédiaire entre les oeufs du cerri et du circulans, je veux donc faire entendre que chez le burgundus le pédicule n'est pas, il est vrai, inséré au pôle de l'oeuf, mais fait avec celui-ci un angle plus petit que 90° et pas très éloigné de 45°[1]. Les parties chitineuses de la tarière de l'*A. burgundus sont*, pour ainsi dire, aussi de leur côté, des formes de transition entre les parties analogues chez l'*A. cerri* (fig. 4) et l'*A. circulans* (fig. 5).

A cette différence vient encore s'ajouter le fait que ma guêpe du cerri possède dans les deux sexes des antennes et des pattes de teinte bien plus claire (presque jaunes) que l'*Andricus burgundus*, et que de plus les dimensions sont nettement plus faibles chez le cerri que chez les exemplaires de burgundus dont je disposais. On peut donc conclure avec pleine certitude que les deux formes sont différentes, même sans parenté étroite l'une avec l'autre. Au contraire, il y a concordance très complète entre les *Andricus cerri* et *A. nudus* Adler; mais malheureusement, ce point a frappé mon attention trop tardivement pour l'apprécier ici à sa juste valeur.

Avant de passer à la description de la ponte chez l'*Andricus cerri*, je crois utile de rapporter ici mes observations sur l'*Andricus circulans*.

6. La galle du circulans.

J'ai, dans ma notice préliminaire, cru devoir établir un rapport entre la galle du circulans et le *Cynips calicis*, et j'ai désigné la guêpe qui en sort sous le nom de *Cynips cerri gemmae*. Mais des recherches suivies m'ont montré que l'on se trouve ici en présence d'une espèce particulière, qui n'a rien de commun avec la guêpe des galles du cerri. Cependant l'hypothèse reconnue inexacte a eu cet avantage de conduire à un étude approfondie de la galle du circulans. Il ne me semble donc pas superflu de décrire brièvement cette dernière.

L'explication fausse que je donnais, en admettant des relations entre le circulans et le calicis, servira en même temps d'exemple des sources d'erreurs auxquelles on est exposé dans les expériences sur l'hétérogénèse.

J'avais très souvent examiné, dans les années précédentes, si les exemplaires du *Quercus cerris* portaient des galles, et jamais je n'en avais trouvé quelque trace.

---

[1]) La forme étrange des œufs de l'*A. circulans* et de l'*A. burgundus* est ici décrite pour la première fois. Il est incontestable qu'elle fournit un nouveau caractere important au point de vue de la systématique des Cynipides.

Comme cette essence n'est pas indigène dans les Pays-Bas et ne se rencontre qu' assez rarement dans les plantations, ce fait se trouvait d'accord avec ce que je croyais pouvoir attendre, et je pensai pouvoir conclure à l'absence complète chez nous de la galle de *l'Andricus circulans,* galle réputée jusqu'ici tout à fait rare. Je fis alors la connaissance de la galle de *l'Andricus cerri* et je crus devoir la considérer comme l'unique galle indigène sur cet arbre. Mais quand je commençai mes expériences de culture avec le *Cynips calicis,* je trouvai, en mai, une galle dans chacun de mes filets de gaze, où j'avais enfermé en même temps une branche de *Q. cerris* et la guêpe que j'étugiais. Je me trouvais ainsi conduit à croire que la galle était le résultat de mon expérience; je la considérai au début comme nouvelle, et je l'appelai *Cynips cerri gemmae.* Je n'appris que plus tard qu'elle était identique à *l'Andricus circulans* Mayr.

Si les exemplaires de *Q. cerris* dont provenaient la plupart des rameaux employés pour mes cultures s'étaient trouvés dans mon voisinage, je me serais problement déjà aperçu plus tôt que les galles du circulans y sont partout présentes, et non seulement sur les *Q. cerris* des stations du calicis ou dans mes filets de gaze. Mais j'avais dans le cours des premières années pris mes matériaux en des endroits éloignés, et je ne m'attendais nullement à avoir pris en même temps que les rameaux de *Q. cerris* une si étonnante quantité de bourgeons renferment des jeunes galles de *l'Andricus circulans* [1]).

Quoique je connusse déjà complètement le développement de la galle du calicis sous l'influence de *l'Andricus cerri,* j'étais si complètement persuadé de la formation du circulans à la suite de la présence d'oeufs du calicis, que je me crus obligé d'admettre un dimorphisme de la deuxième génération du *Cynips calicis;* et je m'aperçus seulement de mon erreur en étudiant la ponte de la guêpe du circulans. Il fut établi tout d'abord qu'elle ne se laissait pas forcer à déposer ses oeufs dans de jeunes glands de *Quercus pedunculata;* mais ce résultat négatif ne suffisait pas à me renseigner. Après bien des essais infructueux je trouvai enfin que *l'Andricus circulans* dépose ses oeufs, au cours de la première moitié de mai, dans les jeunes bourgeons végétatifs axillaires du *Quercus cerris,* et que son cycle de développement tout entier est donc parcouru sur cet arbre seul. Comme vers la mi-mai les fleurs mâles pour l'année suivante ne sont pas encore ébauchées, l'idée que la guêpe du cerri pût être le produit des oeufs du circulans était complètement exclue. Cette observation me mit sur la voie réelle. Tous les rameaux que j'avais employés dans mes expériences avaient déjà dû renfermer, dans beaucoup de bourgeons, les germes des galles du circulans. Cette guêpe devait donc être actuellement dans les Pays-Bas une espèce gallicole très généralement répandue sur les chênes de Bourgogne. Tout ceci me fut confirmé quand je me fis envoyer de nouveau de grosses branches des arbres déjà employés, de Leyde et de Zwolle, lesquels croissent à grande distance des stations du calicis, et sur lesquels je pus aussitôt faire ample récolte de galles du

---

[1]) Les galles de *l'Andricus circulans* se trouvent aussi bien sur les *Quercus cerris* des plantations de Delft, que dans le Jardin botanique de l'Université de Leyde, mais, dans ces deux localités, exclusivement dans la couronne d'arbres de grande taille. A Rheden, au contraire, les galles sont portées par les branches basses et facilement accessibles; et c'était précisement d'ici que j'avais emporté la plus grande partie des branches ayant servi à mes recherches.

circulans. Ces dernières furent également trouvées plus tard aux sommets des grands arbres de *Q. cerris*, dans les plantations de Delft.

Voilà comment l'enigme de la trimorphie fut rayée de la liste de mes recherches, en se montrant n'être qu'une simple observation insuffisante; et il me semble presque incroyable à présent que j'aie pu même un seul moment établir quelque rapport entre le *Cynips calicis* et une guêpe si différente. La méthode comparative aurait dû dans ce cas me montrer aussitôt l'inexactitude de l'expérience, mais on court, en expérimentant, souvent le danger de donner à une expérience faite avec peine une force démonstrative plus grande qu'il ne lui revient en réalité, et en comparaison des résultats obtenus par la patiente observation directe des phénomènes naturels, sans la moindre expérience. Le jugement personnel est donc faussé. Les nombreux travaux actuels qui s'occupent du »mécanisme du développement« donnent une foule d'autres exemples de cette circonstance, prouvant que les fondateurs enthousiastes de cette »science nouvelle« n'ont nullement remplacé les méthodes anciennes par de meilleures. Mais revenons à notre sujet.

La galle du circulans peut affecter deux formes différentes, suivant qu'elle prend naissance sur des bourgeons dormants (Pl. I, fig. 7 *a*, Pl. II, fig. 12) ou sur des bourgeons destinés à s'ouvrir (fig. 7 β, fig. 8). On observe dans le premier cas l'image typique de la galle du circulans d'après la description de M a y r. Dans le deuxième cas il se forme une galle semblable à celle représentée par W a c h t l pour l'*Andricus cryptobius*[1]).

Si l'on dissèque un bourgeon couvert de galles de circulans au cours de la période de croissance, et qu'on étudie les parties constituantes du bourgeon que l'on observe à côté des galles, on s'aperçoit que des influences très énergiques ont été actives même en dehors de la sphère cécidiogène. Une seule galle n'en montre pas beaucoup de traces, il est vrai, mais si plusieurs galles sont développées dans le même bourgeon, l'axe et les écailles meurent entièrement au-dessus et au-dessous de l'insertion de la galle (Pl. I, fig. 8, *v v p*, *v b t* et *v b t'*). Cette désorganisation s'accomplit déja à une période très reculée du développement, et doit incontestablement être attribuée à une substance sécrétée par l'insecte ou par l'oeuf, substance neutralisée et vaincue par l'agent cécidiogène produit par l'embryon. C'est donc un processus analogue à celui que j'ai décrit jadis chez le *Rhodites mayri*, quand il s'attaque aux feuilles de *Rosa rubiginosa*[2]). Le même processus s'observe aussi plus ou moins distinctement chez beaucoup d'autres galles de Cynipides.

A l'état de maturité, la galle du circulans est un petit corps allongé en forme de cocon, jaune ou blanc grisâtre, à surface finement granuleuse, de 2 à 3 mm. de longueur et 1½ mm. d'épaisseur environ. On remarque d'ordinaire à la surface, du côté tourné vers la face interne du bourgeon, une ligne brune, représentant la partie latérale desséchée de la feuille, aux dépens de laquelle la galle a pris naissance. Le sommet organique de la galle est souvent aplati ou convexe, d'autres fois recourbé en crochet. J'ai pu de temps en temps retrouver le pédicule de l'oeuf en contant avec ce sommet. Aussi longtemps que la croissance continue, la galle ressemble à celle du

---

1) *Abh. Bot. Ges.* zu Wien, Bd. 30, p. 538, 1880.

2) Beobachtungen über Cynipidengallen, p. 168, 1881. Je remplacerai ici la dénomination de *Rhodites orthospinae* par celle de *Rhodites mayri*.

Spathegaster verrucosa; elle s'en rapproche aussi dans les grandes lignes par le développement, notamment par l'étendue exceptionnellement grande de la jeune feuille qui est intéressée dans la cécidiogénèse. Ce sont non seulement des centaines de cellules de parenchyme qui y prennent part, mais de plus de nombreux petits faisceaux fibro-vasculaires déjà différenciés en phloème et en xylème; et l'ensemble si hétérogène de ces tissus reçoit, sous l'influence des substances cécidiogènes, sécrétées par l'embryon, une impulsion génétique commune.

Pendant la vie embryonnaire de l'habitant, caractérisée par ce que l'absorption de nourriture a lieu par diffusion, la paroi de la galle est formée d'une tissu nourricier rempli d'albumine et d'huile, enveloppé d'une couche épaisse de parenchyme à fécule; celui-ci est entouré à son tour d'un tissu cortical protecteur à parois épaisses. Tel est le plan ordinaire des galles peu compliquées, telles que nous les offre la génération bisexuée des Cynipides.

Dans la deuxième phase de la vie, la larve ronge complètement le tissu nourricier ainsi que la couche à fécule. A l'époque de la métamorphose en nymphe et en insecte parfait, il ne reste donc que le tissu protecteur sous forme d'une coque gris verdâtre ou jaunâtre, mince comme le papier, et très fragile.

Les galles que j'avais récoltées à la campagne livrèrent passage à l'insecte au commencement de mai, en moyenne vers le 8 mai, c'est à dire une quinzaine de jours avant l'*Andricus cerri.*

7. La guêpe Andricus circulans.

La galle décrite ci-dessus correspond très exactement à la forme désignée par M. Mayr sous le nom d'*Andricus circulans.* Ceci résulte des descriptions dont nous disposons, ainsi que de l'étude que j'entrepris des exemplaires secs récoltés en 1879 par le professeur Wachtl aux environs de Mariabrunn. Cette concordance presque complète s'applique également à la guêpe, qui présente toutefois une certaine différence dans l'époque de sa délivrance. Voici ce que dit M. Mayr à ce propos [1]: »Die im Februar gesammelten Gallen lieferten schon in den ersten Tagen von März eine Anzahl Männchen, während die Weibchen erst nach 8 bis 10 Tagen folgten. Jenen, die ich am 21. März gesammelt hatte, entschlüpften die Wespen im April und bei den am 15. April gesammelten zeigten sich schon viele durchlöchert, obschon aus den vollen sich noch in den nächsten Tagen Wespen entwickelten; im Mai erschien kein *Andricus* mehr, sondern nur wenige *Ceroptres* und Pteromalinen« [2].

[1]) Eichengallen, 1e Hälfte, p. 31, 1870.

[2]) Ja dois encore ajouter que je ne m'aperçus de la différence d'époque de mise en liberté des guêpes qu'en me reportant à la toute première description. En 1882 en effet, M. Mayr dit dans ses »Europäische Arten der gallenbewohnenden Cynipiden«, p. 17, au sujet de *A. circulans:* »fliegt im April aus«. M. Wachtl ne mentionne pas non plus de guêpes adultes en février. L'auteur dit en effet (*Abh. Zool. bot. Ges.*, Wien, 1880, p. 545): »Die Wespen fliegen nach Mayr im Monate April, nach eigener Beobachtung auch noch Anfang Mai aus.«

Ces paroles montrent donc que la forme d'*Andricus circulans* qui a servi a la description précédente, a été une génération d'hiver bisexuée, sortie d'oeufs pondus en automne, en été ou peut être déjà plus tôt.

Quoique mes guêpes (Pl. III, figs. 3 et 4) sorties à l'air libre ne prennent leur vol qu'exclusivement dans la première moitié de mai, je crois cependant hors de doute que ma détermination comme *A. circulans* est exacte [1]).

Je dois avant tout faire observer que les descriptions données jusqu'ici de l'*Andricus circulans*, abstraction faite de l'époque de sortie, s'appliquent littéralement à mes matériaux sous tous les autres rapports; et malgré qu'il soit bien certain que chez les Cynipides il puisse y avoir en même temps ressemblance complète dans la structure du corps entre deux animaux, et certaines différences internes, capables de faire établir des espèces nouvelles, il faut d'autre part se rappeler que ces divergences sont précisément appréciables grâce aux différences de structure des galles. Si ces dernières sont identiques, on peut conclure qu'il y aura aussi identité spécifique entre les habitants. C'est ce qui semble être réalise dans le cas actuel. On s'en convaincra, je crois, en comparant les figs. 11 et 12, qui représentent la galle du circulans telle qu'elle se développe sur des bourgeons dormants, à la fig. 39, Pl. IV, des »Eichengallen« de M. M a y r. Dans ma fig. 11, la branche de *Q. cerris* porte des châtons mâles, sur le point de s'ouvrir; mais les groupes de galles α α ressemblent très exactement à la représentation des mêmes galles fig. 12, sauf que dans le premier cas les guêpes n'en sont pas encore sorties, ce qui a eu lieu dans le deuxième.

Je ne me propose pas de m'étendre plus longuement sur les caractères extérieurs de la guêpe du circulans, et je renverrai à la description donnée par M. M a y r (l. c.), ainsi qu'à mes photographies figs. 3 et 4, Pl. III, qui représentent un mâle et une femelle. Je dois cependant m'arrêter un instant à la particularité interne très caractéristique dont il a été incidemment question à propos des oeufs de l'*Andricus burgundus*. Il s'agit de la forme toute particulière de l'oeuf du circulans (fig. 6, Pl. I), qui s'écarte de celle de tous les oeufs de Cynipides connus jusqu'à présent. On comparera à ce propos mes figs. 3 et 4, Pl. I, qui représentent respectivement la tarière et les oeufs des *Cynips calicis* et *Andricus cerri*, à la fig. 5, où l'on voit les parties correspondantes de *l'Andricus circulans*. On observe que le pédicule de l'oeuf, qui, chez les *C. calicis* et *A. cerri*, est inséré au pôle, de même que chez les autres Cynipides, est inséré, il est vrai, au même endroit chez l'*A. circulans*, mais fait avec l'axe longitudinal un angle presque droit. Comme le corps de l'oeuf ressemble à un pied humain, l'oeuf entier fait l'impression d'un membre postérieur avec une jambe mince. Quand on le considère d'en bas, dans le sens du pédicide, l'oeuf ressemble encore d'une manière frappante à la plante du pied, à cause du rétrécissement dans la région médiane.

L'amabilité de M. le professeur W a c h t l à Vienne m'a fourni l'occasion d'étudier non seulement la galle du circulans, mais de plus un mâle et une femelle remplie d'oeufs de la guêpe de cette galle, pris aux environs de Mariabrunn. J'ai pu

---

[1]) A ces lignes de l'édition allemande du présent travail, je puis ajouter aujourd'hui, 2 février 1807, que j'ai en ce moment dans mes cultures de laboratoire nombre de belles galles du circulans, tout à fait développées et sur le point d'éclore.

Post-scriptum du 20 février: Plusieurs mâles et femelles sont sorties dans ces derniers jours.

constater de la sorte qu'il y a identité parfaite entre ces insectes et les miens, également au point de vue de la forme des oeufs. Les insectes étaient peut-être un peu moins vigoureux et de couleur plus claire que les insectes hollandais, mais il faut cependant, comme je l'ai déjà dit, se rappeler que la couleur des Cynipides conservés à sec pâlit quelque peu.

J'insisterai encore ici sur le fait que l'examen attentif de l'*Andricus burgundus* confirme de plus en plus mon opinion, que cette guêpe est bien plus étroitement alliée à *l'A. circulans* qu'a *l'A. cerri.*

Je dois finalement m'occuper de la question de savoir si chez *l'Andricus circulans* on observe l'hétérogénèse.

On a vu que je n'ai réussi qu'au printemps de 1896 à observer la ponte chez la guêpe du circulans. Comme celle-ci s'opère déjà au commencement de mai, dans les bourgeons végétatifs encore très petits, situés à l'aisselle des jeunes feuilles du *Q. cerris,* le temps nécessaire au développement d'une deuxième génération ne fait assurément pas défaut. D'autre part, les Cynipides qui ne donnent naissance qu'à une génération unique, telles que les *Aulax* et *Rhodites*, ne se développent pas au printemps, mais en plein été, hivernent dans leurs galles et ne pondent aussi qu'en été. Il y a donc ici quelque chance de découvrir une galle nouvelle, que l'on trouvera probablement sous forme d'un très petit corps caché dans le bourgeon ou dans l'axe de celui-ci, d'où sortira peut-être en septembre ou en octobre la guêpe parthénogénique, probablement de très petite taille.

Post-scriptum de février 1897.

Depuis l'époque où les lignes précédentes ont été rédigées, j'ai eu l'occasion de poursuivre le développement des bourgeons de *Quercus cerris* avec les oeufs de *l'Andricus circulans*, dont j'ai observé la ponte en mai 1896 (voir p. 33). Mes observations ont été faites d'abord à l'air libre. Grâce à la localité exceptionnellement favorable de Rheden[1]), les branches marquées de fils de soie sont restées intactes tout l'été; et j'ai pu me convaincre, au cours de l'automne de 1896, qu'elles n'ont nullement donné naissance à une galle nouvelle. J'ai coupé fin décembre les branches portant les bourgeons en observation, et je les ai placées dans de l'eau, dans une chambre chauffée. Chaque semaine, j'ai enlevé à la base des branches un petit fragment pour rafraîchir la surface et assurer l'entrée de l'eau. Actuellement, au début de février 1897, je vois se développer en grande quantité la galle de *l'Andricus circulans* lui-même, lequel se reproduit donc par génération directe, sans l'intervention d'une forme parthénogénique.

Le plus remarquable dans ce résultat, c'est le fait que l'oeuf déposé en mai reste inactif certainement tout l'été et peut-être même aussi pendant le commencement de l'automne. C'est la plus longue durée de vie latente observée jusqu'ici chez des oeufs de Cynipides; car chez le *Neuroterus ostreus,* qui à ce point de vue occupe le deuxième rang, c'est en mai que la génération bisexuée, le *Neuroterus furunculus,*

---

[1]) Cette localité se trouve sur le domaine particulier de Rhederoord, à quelques pas de la station de chemin de fer de Steeg, et cependant dans la plus parfaite solitude de la forêt

dépose ses oeufs dans les nervures des feuilles du *Quercus pedunculata*, tandis que la galle de l'ostreus fait son apparition en septembre.

Si l'on considère le degré de développement imparfait où se trouvent les bourgeons du *Q. cerris* en mai, lors de la ponte des oeufs du circulans, il n'est pas surprenant d'observer, dans le voisinage direct des galles mûres, les lésions si étendues et si profondes dont j'ai parlé plus haut et que j'ai reproduites dans mes figures.

Nous reconnaissons dans l'*Andricus circulans* le premier exemple d'une Cynipide de chêne à génération bisexuée et directe; et il est probable que plusieurs autres Cynipides du *Q. cerris* se trouveront obéir à la même règle. Je crois que les entomologistes futurs feront de notre insecte et de ses congénères, en se basant entre autres sur la forme particulière des oeufs, un nouveau genre qui sera rapproché des *Aulax* et des *Rhodites*.

Après cette digression, je reviens à notre guêpe de l'*Andricus cerri*, dont les talents comme productrice des galles du *Cynips calicis* doivent d'abord nous occuper.

---

8. Ponte chez la guêpe de l'Andricus cerri.

La ponte des oeufs chez cet insecte, ainsi que le développement de la galle du calicis dont je vais m'occuper maintenant, constituent en quelque sorte l'object principal de mes recherches. J'ai eu beaucoup de bonne chance dans les observations que je vais décrire, et quelque incroyable que cela puisse paraitre, il es de fait que je pus m'emparer de centaines de femelles du cerri en train de pondre; mais quiconque a visité la station à Rheden ne s'étonnera pas qu'en un endroit si bien protégé les observations à l'air libre aient pu réussir. Quand on connaît la vivacité de nos petites guêpes, on s'explique de plus qu'en captivité la copulation et la ponte puissent s'observer sans difficulté aucune. Il est du reste bien plus facile d'expérimenter sur les Cynipides bisexuées, malgré leur si petite taille, que sur les animaux à parthénogénèse. Les premières s'y prennent rapidement et profitent à l'instant d'une occasion favorable; c'est comme si elles sentaient combien leur vie est courte, et combien il est donc indispensable de ne pas tarder [1]). C'est en revanche une toute autre affaire de contenter les Cynipides vierges, qui sont très difficiles. On a beau offrir à un *Cynips calicis* les plus beaux boutons de chêne, il lui faut des heures pour se décider à se mettre à l'ouvrage, et elle court continuellement deçà, delà, cherchant mieux. Au moment où j'écris ces lignes (25 mai 1896), trois petites mères de la guêpe de l'*Andricus cerri* sont posées près de moi sur la table, tranquillement occupées à enfoncer leur tarière dans deux jeunes glands. Les insectes, sortis il y a quelques heures de leurs galles, s'accouplèrent, allèrent reconnaitre les environs, et ne tardèrent pas à rencontrer sous la cloche de verre les glands (récoltés près de la

[1]) L'instinct de la ponte est extraordinairement développé chez l'*Andricus cerri*. Des guêpes volant dans ma chambre trouvent des jeunes fruits de chêne répandus sur la table et les percent aussitôt de leur tarière. Seuls de petits glands complètement fanés sont dédaignés. Cette propriété de profiter à l'instant de l'occasion est évidemment utile, car elle épargne aux animaux des recherches vaines dans les forêts, où la découverte des fleurs de chêne doit être difficile.

Haye) qui leur convenaient. Alors commence un travail difficile, car c'est une tout autre affaire pour un animal si délicat de percer de part en part la cupule relativement épaise du jeune gland, (fig. 2, Pl. I, figs. 5 et 6, Pl. II), que pour la guêpe du calicis, avec sa puissante tarière, de percer superficiellement un bourgeon de *Q. cerris* [1]). On a peine à croire que ces insectes si vifs quoique si petits descendent réellement de leurs mères. Quand je les jetai dans l'alcool fort, ils n'eurent plus avant de mourir le temps de retirer leur tarière de la cupule; et je les conserve comme derniers documents d'une étude longue et nullement aisée [2]).

Mes observations et expériences à l'air libre ont été surtout couronnées de succès en mai 1894. Il y eut bien des jours de la première moitié de mai, pendant laquelle le temps fut exceptionnellement beau, où je trouvai pour ainsi dire sur chaque jeune gland de mes arbres en expérience, l'*Andricus cerri.* Cela eut lieu surtout le 13 et le 15 de ce mois. Souvent il y avait deux et trois, et même jusque cinq guêpes posées sur une même cupule. Le temps a changé vers le 16 mai, et est resté très humide et froid durant tout l'été; cependant il s'est formé un nombre énorme de galles du calicis. De telle sorte que l'on peut considérer cette guêpe avec sa descendance comme bien adaptée au climat des Pays-Bas.

J'ai, dans le cours de la même année, marqué au moyen de fils de soie un grand nombre de petits glands sur lesquels je trouvai la guêpe du cerri en train de pondre, comme aussi les rameaux qui les portaient [3]). Je trouvai plus tard des galles du calicis sur la plupart des glands marqués. En 1895, la culture de la galle du calicis réussit sur un des chênes de mon jardin à Delft; et l'intérêt d'une observation pareille résultera de mes photographies 1 à 10 Pl. II, qui représentent les phases de développement successives de notre galle.

Lors de la ponte, la cupule du gland est perforée de part en part et l'oeuf est déposé dans la fente entre la cupule et le gland (*E k* fig. 10); la longueur de la tarière (*L r fig. 4)* et du pédicule de l'oeuf (*E s)* est, comme on pouvait s'y attendre, en rapport avec l'épaisseur de la paroi de la cupule au mois de mai. L'appareil entier est d'ailleurs très délicatement bâti, et la blessure de la cupule est si fine qu'on n'en distingue plus trace dans la suite. Comme dans d'autres cas, je pus tisément observer ici, sur des oeufs artificiellement enlevés du corps, le passage du contenu vitellin dans le pédicule, quand on comprime le corps de l'oeuf, et vice-versa, quand on cesse de comprimer [4]).

[1]) Il y a encore diverses autres guêpes gallicoles chez lesquelles la tarière n'est pas en rapport avec le but à atteindre. C'est ainsi que la guêpe du kollari ne cherche que des bourgeons de chêne très petits, tandis que les dimensions des tarières permettent de perforer les bourgeons les plus grands. Cependant on observe d'ordinaire sous ce rapport une adaptation extrêmement prononcée, permettant certaines conclusions quant à la biologie, si cette dernière est inconnue.

[2]) Les rameaux de chêne conservés à une lumière modérée ainsi que les pédoncules des jeunes glands et les glands eux-mêmes sont dans cette saison tellement bondés d'asparagine que si l'on projette les objets dans l'alcool on voit cette substance sortir de tous les pores corticaux sous forme d'une nuée cristalline blanche.

[3]) Pendant la croissance et grâce à celle-ci, l'aspect extérieur des rameaux change jusqu'à les rendre méconnaissables.

[4]) Quelques embryologistes pensent que l'œuf animal possède la polarité. Ceci peut être vrai dans quelques cas déterminés; mais on a peine à croire qu'il en serait ainsi chez les Cynipides, quand on a vu, comme il est si facile de l'observer ici, le contenu *liquide* de l'œuf passer du corps dans le pédicule et en sens inverse.

Quant à la tarière de la guêpe du cerri (*Lr* fig. 4), remarquons encore que la gouttière est complètement lisse, tandis qu'on y trouve chez le calicis une demi encoche et trois entières. Le sommet est complètement droit, et non recourbé comme chez le calicis. Les plaques carrée *(Qp)*, oblongue *(Op)*, et angulaire (*Wp*) sont chez le cerri la miniature de ce qu'elles sont chez le calicis.

J'ai tâché avec succès de retrouver l'oeuf qui vient d'être pondu. Ceci ne pouvait réussir que sur des coupes transversales, car surtout le revêtement pileux de la cupule (non représenté fig. 10), oppose de grandes difficultés à la confection de coupes longitudinales. La position de l'oeuf fut dessinée au moyen du prisme et représentée dans l'esquisse d'une coupe longitudinale, faite au même stade du développement. La fig. 10 donne donc une image très exacte de l'état naturel des choses, sans toutefois représenter les poils cupulaires ni la compression de l'oeuf, résultant de ce qu'il est enfoncé dans l'interstice, ni enfin l'accumulation du contenu de l'oeuf dans le pédicule, correspondant à cette compression.

Il est remarquable que le corps de l'oeuf *(E k* fig. 4) de la toute petite guêpe *Andricus cerri,* sans son pédicule, est de même taille (peut être même un peu plus grand), que celui (*E k* fig. 3) de sa gigantesque mère. L'un et l'autre ont une épaisseur d'environ 0,1 mm. et une longueur de 0,2 mm. Les pédicules au contraire atteignent chez la première guêpe jusque 0,3 mm, chez la dernière jusque 1,5 mm. Ils sont légèrement dépassés en longueur par les tarières correspondantes.

Le volume de l'oeuf fait qu'une guêpe de cerri ne renferme que 30 oeufs environ, tandis que le *Cynips calicis*, qui produit un descendant si minuscule, en renferme 700 à 800 de la même grandeur. Il est clair que la masse principale de ces oeufs doit se composer de nourriture destinée aux embryons; et ce n'est donc assurément pas un fait inattendu que les embryons des deux générations sont à peu près identiques, et ont des besoins égaux, tout au moins pour ce qui concerne la nutrition, aussi longtemps que celle-ci dépend des matériaux de réserve de l'oeuf.

---

9. Développement de la galle du Cynips calicis.

L'oeuf de l'*A. cerri* est déposé par la guêpe, comme nous l'avons vu, exactement au fond de l'interstice annulaire existant entre la cupule et le gland (*E k* fig. 10). Le groupe cellulaire influencé par l'oeuf appartient d'ordinaire à la limite entre ces deux organes, de telle sorte que la plupart des galles mûres sont fixées, à côté du gland, sur le fond de la cupule (Pl. III, fig. 10). Quelques galles cependant, comme nous l'avons déjà dit plus haut, sont portées par le gland lui-même, (Pl. II fig. 8) et montrent que l'oeuf du cerri est parfois déposé un peu trop haut. Et comme on sait que toute la zone annulaire de la paroi du gland, comprise dans la cupule, est susceptible d'accroissement, la cécidiogénèse n'est pas empêchée, il est vrai, par la position élevée de la galle, mais les galles restent petites, et d'autant plus petites qu'elles sont adhérentes à une portion plus élevée de cette zone. Toutes les jeunes galles ainsi insérées finissant par être complètement soulevées hors de la cupule par le gland en voie de croissance, il s'ensuit que l'on peut trouver toute une série de galles mûres,

insérées sur des glands, dont les plus petites ne renferment pas de larve et sont de la grosseur d'une tête d'épingle, tandis que les plus grosses sont normalement développées. Comme la zone la plus jeune (*p* fig. 10, Pl. I) de la cupule du gland correspond précisément à son rebord supérieur, où jamais ne sont déposés des oeufs de cerri, on comprend que l'on ne trouve jamais les galles du calicis reliées à la partie supérieure de la cupule [1]).

Quoiqu'il ne soit pas possible, il est vrai, de donner une évaluation exacte du nombre des cellules, qui subissent l'influence de l'oeuf du cerri, il y a cependant moyen de fixer à peu près un nombre minimum. On se servira à cet effet du fait que les faisceaux fibro-vasculaires si ténus, qui circulent dans la paroi du gland, sont intéressés dans tous les cas dans la production de la galle, même quand les oeufs sont déposés, vers la fin de la période de liberté de la guêpe du cerri, (période qui dure une quinzaine de jours), sur la base du gland. D'où il suit que le nombre des cellules qui séparent les faisceaux de l'oeuf est très variable, parce qu'il s'agit ici d'un tissu méristématique, en état de division cellulaire très active. Je trouvai, à l'occasion de divers dénombrements, qu'il peut y avoir de cinq à dix cellules entre l'oeuf et le faisceau le plus voisin. Or si l'on se figure la zone d'influence de l'oeuf comme une demi-sphère de cinq cellules de rayon, on voit que 250 cellules environ, placées en dehors des vaisceaux fibro-vasculaires, doivent collaborer à la production du méristème de la galle. Si la longueur du rayon est de 10 cellules, il y a environ 2000 cellules qui servent à la cécidiogénèse. Mais le plus remarquable, c'est que les éléments déjà différenciés des faisceaux eux-mêmes, situés en dessous de ces cellules, sont encore intéressés dans l'hypotrophie, et les nombres ici cités sont donc à coup sûr bien plus petits que les nombres réels.

Les phénomènes morphologiques, qui s'accomplissent au début de la cécidiogénèse, correspondent dans les grandes lignes aux phénomènes d'enveloppement de l'embryon des Cynipides, que j'ai décrit en détail à une autre occasion pour plusieurs galles. Mais dans le cas actuel le développement s'accomplit d'une manière tellement cachée, et il est si extrêmement difficile de se procurer des matériaux propres aux recherches, que je me suis arrêté dans mon étude, quand j'eus obtenu des préparations assez décisives pour donner une idée exacte des phénomènes qui provoquent la position de l'embryon au sein du méristème de la galle. On trouve dans la fig. 11 une image simplifiée d'une telle préparation. Le pédicule de l'oeuf me semblait être visible dans l'épaisseur de la paroi de la cupule; et je pus tout au moins retrouver la coquille exactement au-dessus de l'embryon, qui venait d'être enveloppé (cet embryon est représenté dans la figure par *Lk*).

Les phases ultérieures du développement doivent être sans doute les mêmes que chez la galle du *Cynips kollari*. En effet, à un état plus avancé du développement, représenté par la fig. 12, les mêmes tissus si extrêmement caractéristiques que l'on peut observer chez cette galle se laissent également démontrer ici, et dans le même orde. Il est donc très probable que la voie suivie, partant du même point, et conduisant au même but, sera dans les deux cas la même. Je dois cependant faire observer que la cupule de la galle, qui apparaît déjà d'une manière très précoce, et comme une

---

[1]) Les galles des *Cynips caput medusae* et *C. superfetationis* se développent au contraire aux dépens du rebord supérieur méristématique de la capule (*p* fig. 10).

excroissance latérale, à la base de la jeune galle (*gc* fig. 12, Pl I), en affectant la forme d'une deuxième circonvallation, est une production nouvelle, qui fait défaut, morphologiquement parlant, chez le kollari, (ou du moins n'est visible dans quelques galles mûres de cette espèce qu'à l'état rudimentaire, et est représentée par la »couronne«). Il faut donc, pour établir une comparaison exacte entre les deux galles, commencer par ne pas tenir compte de la cupule de la galle du calicis. Mais dès lors la concordance est très complète, depuis le début jusqu'à la fin du stade embryonnaire de la vie larvaire [1]). En effet, la succession des tissus est durant cette période, de l'intérieur vers l'extérieur: tissu nourricier oléifère et albuminifère (*n g* fig 13, pl. I), tissu à oxalate de calcium (*k r*), parenchyme à fécule (*p s* + *s g*), tissu cortical à parois épaisses ou minces (*g r*) et épiderme (*e p*). Les trois premiers tissus sont caractéristiques, à ce que je crois, non seulement pour les deux galles citées seules, mais de plus pour toutes les galles quercicoles hautement différenciées de ce groupe [2]). Les phénomènes de croissance, succédant au stade embryonnaire sont dûs chez la galle du kollari à l'activité considérable de la »zone cambiale«, qui fait défaut chez la galle du calicis; en effet, l'équivalent physiologique de l'écorce épaisse du kollari doit être cherché dans la cupule du calicis. La formation de la couche de cellules lignifiées, qui composent la paroi définitive de la galle interne chez le calicis, se fait immédiatement aux dépens de l'écorce (*g r*) de la galle. Or cette écorce commence, chez le kollari, par donner la zone cambiale, et celle-ci donne alors, vers l'intérieur, naissance au tissu de cellules ligneuses de la chambre larvaire, vers l'extérieur à l'épaisse écorce à tannin. On comprend que chez le calicis, ce soit la cupule de la galle qui contienne le tannin. Cette différence d'origine des tissus tannifères constitue peut-être la distinction principale entre les deux galles.

Au point de vue anatomique, le revêtement de la surface libre de la cupule, qui est couverte de poils glandulaires secrétant du mucilage (*e p* = *c l* fig. 13), est remarquable. Il en a déja été question au § 1. Les poils, qui sont formés de quatre cellules cylindriques, superposées, se trouvent très près les uns des autres, de manière à former une surface luisante, qui ne donne nullement l'impression d'un revêtement pileux. La sécrétion de mucilage se fait entre la paroi cellulaire et la cuticule de la cellule terminale. La cuticule est distendue et finalement se déchire. La sécrétion mucilagineuse est si abondante, que la galle, pendant sa période entière de croissance, a un aspect humide, et que mêde des gouttelettes s'en détachent. Si l'on sèche de jeunes galles, on aperçoit le mucilage, entre les inégalités de la cupule de la galle, sous forme de petits fragments et bâtonnets d'un blanc jaunâtre, qui ne se gonflent pas quand on les humecte, et se comportent donc comme de la cellulose bien plus que comme de la gomme végétale. Nous avons déjà dit au § 1 que le mucilage sert à écarter les parasites et les commensaux [3]).

---

1) Ce stade est caractérisé par ce que la nutrition ne se fait que par diffusion. Dans le stade immédiatement suivant les tissus sont rongés et dévorés par la larve.

2) Comme par exemple les *Cynips hungarica, argentea, galeata, caput medusae, tinctoria*, etc.

3) La sécrétion de mucilage, comme moyen de défense contre les insectes nuisibles, s'observe fréquemment chez les galles de Cynipides. D'autres exemples frappants nous sont offerts par les galles des hartigii, serotina et glutinosa. Chez le sieboldii, on dit que la surface, d'un rouge carmin, secrète du nectar, et que les fourmis les recouvrent

Comme je ne crois pas que les phénomènes de développement externe de notre galle aient jamais été figurés, je donne Pl. II quelques photographies d'après des matériaux secs, représentant les stades successifs de croissance en juillet, août et septembre. Elles ne réclament pas de plus ample explication.

Au point de vue physiologique, l'historire du développement de la galle du calicis, comme celle de toutes les galles de haute différenciation, conduit à des considérations d'une grande importance, qui intéressent, non seulement la théorie du développement ontogénique, ce qui a déjà été mis en lumière plus haut, mais de plus la doctrine de la variabilité.

Un mot d'abord sur la signification des galles pour l'idée que l'on doit se faire des phénomènes ontogéniques.

Les galles en général, et celles des Cynipides en particulier, sont soumises à la règle suivante: Plus la différenciation définitive de la galle est élevée, d'autant plus précoce est la période de développement à laquelle les cellules initiales des tissus végétaux sont influencées par les sécrétions animales. Il n'y a cependant pas de galle de Cynipide, qui prenne naissance aux dépens d'une cellule méristématique unique. C'est toujours un groupe cellulaire de l'hôte qui est transformé en galle. Nous avons vu plus haut que ce groupe peut renfermer, chez la galle du calicis, p. ex., de 250 à 2000 cellules. Pour rencontrer des galles qui prennent naissance aux dépens d'une cellule unique, il faut descendre jusqu'aux formations d'ordre inférieur, telles p. ex. que les érinées produites par les *Phytoptus.* Or l'origine pluricellulaire de toutes les galles élevées me paraît être un fait de grande importance, et de signification décisive pour l'explication physiologique de tous les processus ontogéniques, par conséquent aussi pour la formation des organes normaux. On ignore, il est vrai, la nature des forces déterminantes qui règlent l'ontogénie. On ne saurait davantage dire avec certitude qu'elles sont de même ordre que les forces actives dans la cécidiogénèse, et l'on ne peut affirmer en outre que ces forces sont identiques dans le développement normal de diverses espèces ou divers groupes de formes alliées. Cependant il serait peu scientifique de ne pas conclure provisoirement à l'analogie, jusqu'à ce que l'on ait découvert des faits qui soient en désaccord avec cette hypothèse. Il semble actuellement très improbable que des faits pareils existent. Bien au contraire, tout, dans l'état présent de nos connaissances de la cellule et du développement, indique que les mêmes lois se font valoir partout où s'opèrent des processus ontogéniques. Cela est vrai aussi bien du développement normal des animaux que de la formation des organes chez les plantes, et de la naissance des galles. Il est évident qu'entre ces divers phénomènes il y a la concordance la plus absolue, et que les mêmes facteurs sont en action dans les cellules d'un méristème animal ou végétal, donnant lieu d'une part à un organe normal, de l'autre à une galle. Ceci admis, on se trouve amené à conclure que dans la formation d'un organe dans un mèristème, c'est-à-dire dans l'ontogénie en général, quand des groupes cellulaires de plus ou moins d'étendue concourent à la formation d'un tissu homogène, un faisceau fibro-vasculaire, une glande, etc., des substances liquides, circulant dans le tissu tout

---

d'une enveloppe cylindrique de terre, dont elles écartent les insectes ennemis. En Hollande, la surface de la galle du sieboldii est, il est vrai, rouge foncé, mais complètement sèche. Je n'ai pu découvrir de construction de fourmis.

entier, déterminent tout aussi bien la forme acquise dans ces cas que dans le cas indubitable des jeunes galles. Mais n'avons nous pas ainsi appelé l'attention sur un facteur demeuré jusqu'ici hors de considération dans les théories récentes du developpement? Et si l'on n'en a pas tenu compte, n'est-ce pas parce que l'on croit être certain que les caractères acquis ne sont pas héréditaires et que par suite l'hypothèse de l'existence de matières formatrices circulant dans les tissus est insoutenable?

Il résulte avec certitude, à mon avis, de l'observation précédente, que, malgré la ténacité avec laquelle les caractères des organismes restent adhérents au corps cellulaire, il y a cependant des substances en circulation, qui prennent part au développement de la forme définitive et des caractères physiologiques. Elles y prennent une part aussi active que les unités vitales, admises aujourd'hui par des savants des plus distingués, unités qui constituent au moins en partie le protoplasme cellulaire.

Je dois cependant insister ici une seconde fois sur le fait que le transport des substances qui, dans la cécidiogénèse, déterminent la forme, n'est établi avec certitude que pour les tissus méristématiques en voie d'accroissement. La cécidiogénèse ne fournit en faveur de l'hypothèse d'une pareille circulation dans l'intérieur d'organes mûrs pas plus de preuves que l'ontogénèse normale.

Ce n'est pas d'ailleurs pour l'ontogénèse seule que la cécidiogénèse a une haute signification, mais de plus pour la manière dont il faut juger les phénomènes physiologiques de la variation, c'est-à-dire la théorie du développement phylogénique. On ne peut nier en effet que les tissus végétaux qui se transforment en galle aient varié. Nous savons, depuis que Darwin a publié sa Pangénèse, que l'on peut se représenter la variabilité comme quantitative ou qualitative. Et si l'on s'appuie sur la théorie des unités vitales, cette proposition revient à admetre la multiplication anormale d'une seule espèce d'unités, déjà présentes dans la cellule, ou la néoformation d'unités non encore existantes. Darwin lui-même croyait que, dans la cécidiogénèse, il faut songer à la variabilité qualitative; et je crois aussi à l'heure qu'il est que cette opinion mérite la préférence. Elle est certainement d'accord avec l'observation directe, et, ce qui lui donne une plus grande valeur encore, elles est en réalité complètement indépendante de l'hypothèse des unités vitales. Au contraire, la cécidiogénèse, envisagée comme variabilité quantitative, c'est à dire comme multiplication d'unités vitales déterminées, déjà existantes, suppose démontrée l'existence de ces dernières, et se fonde donc sur une double hypothèse.

J'ai, il est vrai, démontré jadis [1]) que les propriétés des galles qu'il faut considérer comme réellement neuves, — c. à. d. comme ne résidant pas déjà directement dans la plante-mère, — ne possèdent qu'une très faible constance, et disparaissent très rapidement quand les tissus de la galle se développent au-delà de la limite normale. Je suis actuellement persuadé que je n'ai pas enlevé par les expériences décrites dans mon travail antérieur, son fondement à l'opinion qui envisage la cécidiogénèse comme un phénomène de »variation qualitative«. Car la variabilité, chez les plantes comme chez les animaux, s'observe à tous les degrés, depuis les fluctuations à peine perceptibles des propriétés dans la croissance individuelle jusqu'à la permanence très complète dans la transmission héréditaire sexuelle. Je crois donc avoir simplement montré, dans le travail en question, que la variabilité qui fait

[1]) *Botan. Zeit.* Bd. 46, p. 10, 1888.

naître les tissus des galles aux dépens des cellules végétales, possède ce degré inférieur de transmissibilité que l'on peut également observer dans des cas très nombreux de variabilité normale [1]). D'ailleurs, les diverses formes et gradations de la variabilité sont bien mieux connues à présent qu'en 1888.

Mais si l'on se trouve fondé à considérer les galles comme des produits de la variation, qu'apprennent-elles au point de vue de la théorie physiologique de la variabilité? La réponse est qu'elles apprennent que la variabilité peut être un phénomène multicellulaire. Je suis absolument convaincu que la variabilité est ordinairement monocellulaire, — qu'elle réside dans le domaine d'une seule cellule germinative, d'une seule cellule de méristème primordial, d'une seule cellule-mère primitive, donnant naissance à la variation d'un bourgeon. Je soutiens seulement qu'il ne doit pas toujours en être ainsi, et que, la cécidiogénèse le montre, une théorie exacte de la variabilité ne peut tenir uniquement compte de cette circonstance, mais doit également reconnaître la possibilité de la variabilité multicellulaire, et régler là-dessus ses tentatives d'explication.

Quelle que soit d'ailleurs l'opinion que l'on ait au sujet des causes efficientes de la variabilité en général, la cécidiogénèse nous apprend que la »variabilité des tissus«, c'est-à-dire la variabilité multicellulaire doit être très probablement rapportée à des substances liquides, qui circulent sur de faibles distances dans les méristèmes. L'analogie nous force à admettre que la »variabilité cellulaire«, tout au moins dans sa forme fluctuante, et à peine transmissible, dont il a été question plus haut, peut être également le résultat de substances liquides, qui traversent le protoplasme cellulaire sans quitter la cellule. Les nouveaux caractères mieux fixés supposent que ces substances liquides sont saisies par des unités vitales déterminées, c'est-à-dire qu'ils supposent précisément l'existence de nouvelles unités vitales. Ceci crée en même temps une hypothèse au sujet de la permanence si différente des propriétés. Il est à peine nécessaire de faire ressortir que l'opinion ici défendue est entièrement différente de l'idée d'une circulation, dans le corps adulte, de substances déterminant la forme. L'existence de pareilles substances, réclamée par l'explication de l'hérédité des caractéres acquis, a été, à ma conviction, suffisamment réfutée par M. Weissmann.

Toutes ces considérations sur l'ontogénie et la phylogénie, auxquelles les recherches sur la cécidiogénèse nous forcent continullement, me semblent encore d'une grande valeur en ce qu'elles montrent avec une clarté surprenante l'existence d'une profonde analogie entre la différenciation résultant de l'ontogénèse et la différenciation résultant de la variabilité.

Il me semble d'ailleurs que les nombreux écrits des derniers temps relatifs à la théorie du développement ont tous en général le même côté faible, de démontrer de la part de leurs auteurs si peu de familiarité avec le phénomène, cependant si important pour le présent sujet, de la cécidiogénèse. Je crois que la cause de ce fait est de na-

[1]) De bons exemples de pareilles variations excessivement instables nous sont fournis par beaucoup de fasciations, surtout celles du frêne, du saule, de l'érable et de l'aune. On peut sans peine découvrir une série de formes, en partie si peu constantes, qu'elles disparaissent déjà plus ou moins vite au cours de l'accroissement en longueur du rameau, pour une autre partie assez constantes pour persister aprés la greffe, auquel cas elles peuvent être cultivées comme variétés de pépinière; une dernière partie enfin est sexuellement constante, ce qui en permet la propagation par semis.

ture historique, et creee par l'état présent des manuels. Beaucoup d'auteurs d'aujourd'hui considèrent, sur la foi des opinions de jadis, propagées par ces livres dont notre jeunesse est imbue, les galles ou comme de simples »productions pathologiques«, dont le développement obéit à d'autres lois que celui des organes normaux, ou comme des »productions irritatives«, résultant des même causes que p. ex. les phénomènes de courbure par croissance présentés par certains organes sensibles. On conçoit que des idées si peu claires n'engagent pas à une étude plus approfondie. Mais du moment que l'on s'occupe plus en détail et sans idées préconçues, du développement des galles, on se sent amené à abandonner toutes ces opinions, et à prendre les galles pour ce qu'elles sont: des productions, qui font voir sous un nouveau jour les lois de l'organogénie normale et de la variabilité.

Explication des figures.

Pl. I.

Fig. 1 (4). *Cynips calicis* au moment de la ponte (20 mars 1894), sur un bourgeon floral de *Quercus cerris*. D'après une photographie. Revêtement pileux dessiné seulement en partie.

Fig. 2 (8). *Andricus cerri* au moment de la ponte (15 mai 1894), sur un jeune gland de *Quercus pedunculata*. D'après la photographie d'une pièce conservée dans l'alcool Revêtement pileux partiellement représenté.

Fig. 3 (18). Tarière et œufs du *Cynips calicis*.

Fig. 4 (18). Tarière et œufs de l'*Andricus circulans*.

Fig. 5 (18). Tarière et œufs de l'*Andricus cerri*.

Qp plaque carrée, *Op* plaque oblongue. *Wp* plaque angulaire, *Lv* tarière, *Ek* corps de l'œuf, *Es* pédicule de l'œuf.

Fig. 6 (72). Œuf de l'*Andricus circulans* fortement grossi.

Fig. 7 (4). Rameau de *Quercus cerris* portant des galles du cerri γ, des galles du circulans α, issues de boutons dormants, et des galles du circulans β, issues de boutons destinés à s'ouvrir.

Fig. 8 (9). Galles du circulans d'un bouton destiné à s'ouvrir, dont les écailles etc. ont été enlevées. Les galles sont développées à l'endroit des bases des feuilles, et sont insérées au'dessous du sommet, décomposé, de l'axe du bourgeon (*vvp*); en *vbt* et *vbt*, des feuilles mortes.

Fig. 9 (8). Deux galles de cerri sur une fleur mâle de *Quercus cerris*. Chacune des galles montrait nettement une moitié d'anthère desséchée (*ant'*). L'axe floral est figuré par *aes*, la bractée par *sbt*, les trois étamines visibles, non métamorphosées en galles, par *ant*.

Fig. 10 (18). Coupe longitudinale de la fig. 2 pour montrer la position de l'œuf du cerri *Ek Es*, entre la cupule *ec* et le gland *e*; *q* est le périanthe desséché, *n* le stigmate, *p* l'anneau de méristème de la cupule; *Lk* embryon.

Fig. 11 (30). Début de l'enveloppement de l'œuf du cerri (= embryon du calicis) par le méristème de la galle *gp*; *Es* pédicule de l'œuf enfoncé dans la cupule *ec*; *e* gland; *p* anneau de méristème du bord de la cupule.

Fig. 12 (5). Coupe longitudinale de deux jeunes galles du calicis dans une cupule de chêne *ec*. Au milieu le jeune gland *e*; *lk* chambre larvaire; *gc* cupule de la galle; *q* périanthe. Dessiné le 20 juillet 1894.

Fig. 13 (7). Jeune galle de la figure précédente, grossie; *lk* chambre larvaire; *ng* tissu nourricier; *kr* tissu à cristaux d'oxalate de calcium; *ps* + *sg* tissu à parois minces rempli en partie de fécule, et correspondant au tissu à amidon primaire et secondaire de la galle du kollari; *gr* tissu cortical à parois épaisses; *nb* cicatrice de l'orifice de la loge; *gc* tissu à tannin de lc cupule de la galle; *ep* épiderme avec la couche de poils à mucilage *cl*.

Fig. 14 (réduite). Aspect de trois galles du calicis, fixées non dans des cupules, mais sur les glands mêmes. Les galles de droite et en bas sont insérées non loin du sommet du gland, et sont restées petites par suite de cette position.

Pl. II.

Héliogravure de photographies d'après nature.

Fig. 1—10 (légèrement réduites). Stades du développement de la galle du calicis photographiés d'après des matériaux secs: 1, 2, 3 vers la mi-juillet; 4, 5, 6 au commencement d'août; 7 et 9 en septembre; 8 gland avec galle du calicis; 10 coupe d'une galle du calicis, montrant l'insertion ordinaire dans la cupule du gland, la galle interne et la cupule de la galle.

Fig. 11 (3). En α, galles du circulans mûres, non encore sorties, dans des bourgeons qui portent en même temps des châtons mâles.

Fig. 12 (4). Galles du circulans, déjà abandonnées, dans un bourgeon dormant.

Fig. 13 (4). Jeune galles du cerri, de mes cultures, sur des châtons mâles en train de s'ouvrir. A gauche le bourgeon du *Q. cerris* avec feuilles stipulaires longues, développées en écailles de bourgeon.

Pl. III.

Héliogravure de photographies d'après nature.

Fig. 1 (10). *Cynips calicis.* L'annimal était encore en vie, et faisait vibrer l'antenne gauche, qui est pa là trop épaisse.

Fig. 2 (10). Femelle de guêpe du cerri (*Andricus cerri*).

Fig. 3 (10). Femelle d'*Andricus circulans.*

Fig. 4 (10). Mâle d'*Andricus circulans.*

Fig. 5 (7). Silhouette d'une guêpe du cerri en train de pondre, conservée dans l'alcool.

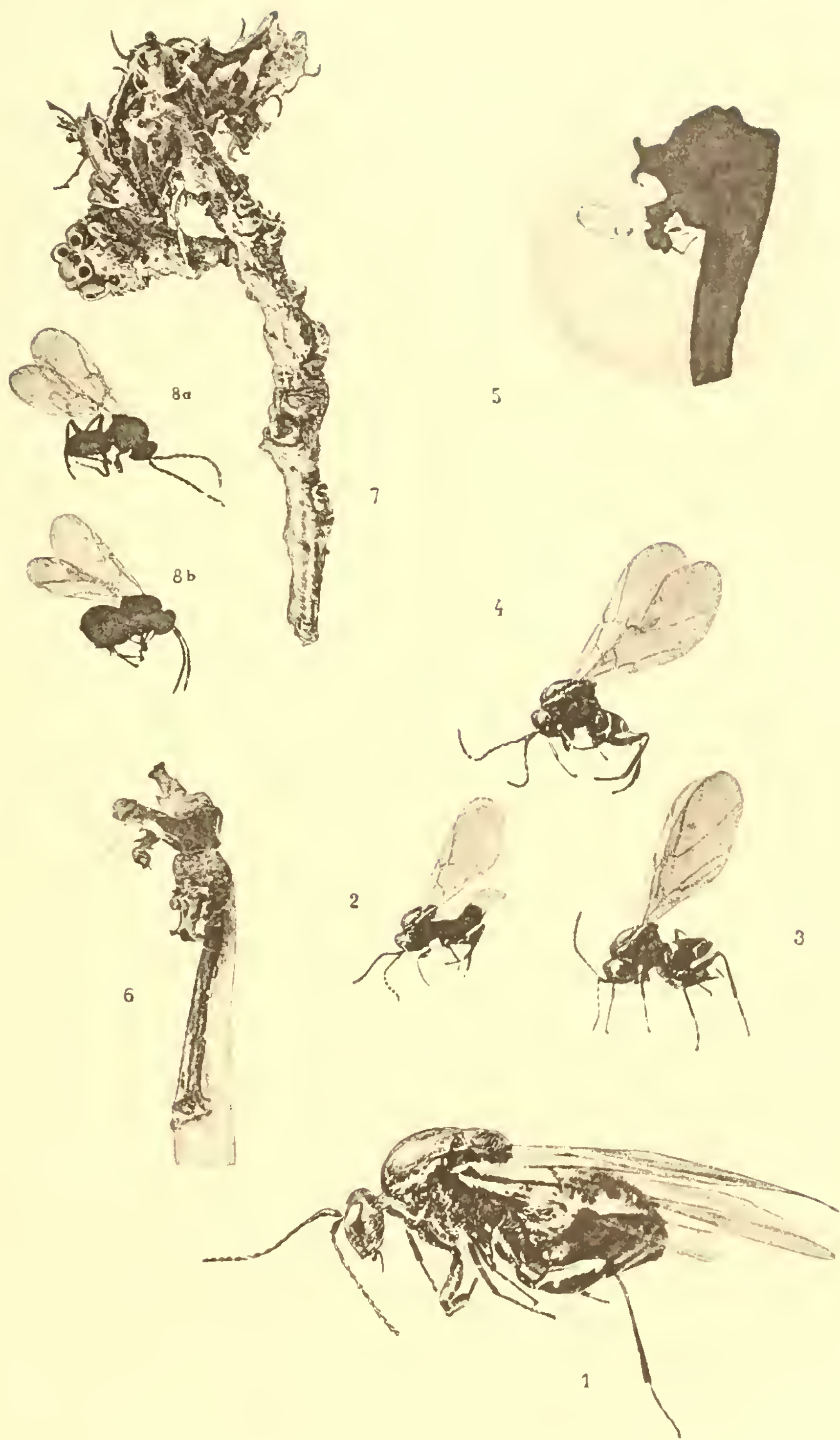
Fig. 6 (6). Photographie directe d'une guêpe du cerri en train de póndre, d'après une préparation sèche. L'axe de l'inflorescence est collé au moyen d'un morceau de papier.

Fig. 7 (3). Rameau de *Quercus cerris* avec un groupe de galles de l'*Andricus burgundus*; d'après une préparation sèche de M. le professeur Wachtl.

Fig. 8 (10). Mâle (8*a*) et femelle (8*b*) d'*Andricus cerri*, conservés dans l'alcool.




1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
a
a
11
12
13


8a
8b
7
5
4
2
3
6
1

Het bacteriologisch laboratorium der Polytechnische School.

Rede, Delft, 1897[1]).

But then our subjects are so glorious, that to work at them rejoices and encourages the feeblest, delights and enchants the strongest. Faraday.

Het oogenblik is gekomen om stil te staan bij den aard en de bedoeling van dit Laboratorium. Waarom is het opgericht? Welke werkzaamheden worden er in verricht en zullen er in de toekomst in verricht worden? Waarin bestaat het bijzondere karakter van Bacteriologisch Onderzoek?

De naam Bacteriologisch Laboratorium sluit niet volledig het doel in, waarvoor het aan de P. S. werd verbonden. Niet alleen Bacteriologie, maar ook Technische Mikroskopie stond op het programma, waarmede bij de oprichting moest worden rekening gehouden. Toch is de naam welgekozen, want daardoor wordt de hoofdbeteekenis der inrichting met juistheid aangewezen. Technische Mikroskopie is geen wetenschap, het is de toepassing van het mikroskoop bij praktische vraagstukken, welke tot verschillende wetenschappen kunnen behooren. Wenschte men, dat ook deze bedoeling bij benadering uit den naam kon worden afgeleid, zonder het wetenschappelijke karakter van dien naam op te offeren, dan zou »Biologisch Laboratorium« wellicht 't meest aanbeveling verdienen, hoewel daardoor den schijn gewekt zou worden van een veel omvangrijker beteekenis der inrichting, dan met de werkelijkheid overeenkomt, want de term Biologie omvat tevens verschillende andere wetenschappen, welke hier niet thuis behooren, zooals bijv. de Zoölogie, de Pathologie, de Embryologie en eenige meer.

Ik zal beginnen met de strekking van het onderwijs in de Technische Mikroskopie uiteen te zetten, maar vooraf een woord over het onderwijs voor de Technologen aan de P. S. in het algemeen.

De bedoeling daarvan is tweeledig: 1e Het geven van een wetenschappelijke opleiding, 2e Het aanbrengen van nuttige kennis. Het laatste moet naar mijn gevoelen, uit het onderwijsoogpunt over het algemeen als bijzaak worden beschouwd, want daarvoor is eigenlijk het gansche latere leven bestemd. Een wetenschappelijke opleiding is daarentegen alleen in de jeugd te verkrijgen, en wat daardoor o. a.

---

[1]) Bij het uitspreken der rede waren ook het Bestuur der P. S. en de Docenten der Technologische en Mijnbouw Afdeeling tegenwoordig. Ik zeg bij deze gelegenheid mijn hooggeschatte collega's daarvoor mijn hartelijken dank.

bereikt wordt is de geschiktheid om nuttige kennis van nutteloos weten te onderscheiden en gemakkelijk tot zich te nemen. Niemand kan er een oogenblik aan denken, dat uit deze woorden en uit andere dergelijke toespelingen in mijn voordracht geringschatting voor nuttige kennis zou blijken; ten overvloede wensch ik echter nog te herhalen, dat ik die als een gewichtige levenstaak beschouw, en alleen mijn gedachten uitspreek over de beste middelen om dit ver over het onderwijs heenreikende doel te verwezenlijken [1]). Aan en Polytechnische School moet natuurlijk het streven bestaan om beide doeleinden zooveel mogelijk gelijktijdig te bereiken, zonder de subordinatie daarvan uit het oog te verliezen. Dit is in zoover moeielijk, als de docenten zich daardoor beperkt kunnen gevoelen bij de keus der concrete feiten en voorbeelden, waaraan de algemeene beschouwingen, — als grondslag der wetenschappelijke opleiding, — bij voorkeur moeten worden vastgeknoopt, nl. de nuttige. Maar het is voor het onderwijs zelve ten slotte toch dubbel vruchtbaar, want bijna zonder uitzondering is alles wat nuttig is voor het praktische leven beter doorgebracht, rijker geworden aan wetenschappelijken inhoud, dan de in de groote maatschappij minder bekende onderwerpen en dientengevolge juist daardoor buitengewoon geschikt het onderwijs belangrijk te maken en in veelzijdige richtingen bij begaafde toehoorders ideeën op te wekken. En zoo kan, en naar mijn oordeel moet, zonder het tweede doel op te offeren, bij het onderwijs vooral aan het eerste worden gedacht, terwijl het najagen van nuttige kennis alleen, niet thuis behoort in het kader van vrije studie en hoogere ontwikkeling.

De drie middelen, die ons ter beschikking staan om ons doel te bereiken zijn: de colleges, de praktische oefeningen en de uitvoering van zelfstandige wetenschappelijke onderzoekingen.

Op de colleges kunnen de theoretische grondslagen in samenhang behandeld, de hoofdfeiten geordend, gegroepeerd worden. Het nadeel van colleges is, dat de leerlingen daarbij op den achtergrond treden, de individualiteit van den leeraar te veel op den voorgrond; daarbij komt dat vele onderwerpen voor colleges weinig geschikt zijn. Zeer goed geschikt daarvoor zijn vakken, waarbij het mogelijk is, uit duidelijke concrete gegevens, door korte logische redeneeringen tot scherp omschreven gevolgtrekkingen te komen, gelijk dit bij de Natuur- en de Scheikunde het geval is.

Kan meer dan elders, naast het streven naar wetenschappelijke vorming, op het verwerven van nuttige kennis het zwaartepunt gelegd worden, zooals bij Mechanische- en Chemische Technologie, ook dan komen colleges tot hun volle recht.

Worden de onderwerpen der voordrachten meer ingewikkeld, vereischen zij veel mathematische voorbereiding, dan kunnen de draden der redeneering van den leermeester, ook al blijven zij zichtbaar, in de hoofden der toehoorders nu en dan afbreken en dan wordt de stilte van de binnenkamer onschatbaar voor 't opnieuw aanknoopen ervan.

Buitengewoon groot worden de moeielijkheden echter, wanneer de draden, die de feiten verbinden eerst zichtbaar worden door de aaneenschakeling van lange

[1]) Dat ik alle zuiver wetenschappelijke ontdekkingen, ook al schijnen zij slechts van theoretisch belang te zijn, als in hooge mate nuttig beschouw, zal ik hier wel niet nader behoeven uit een te zetten.

reeksen van die feiten zelve. Dit is het groote bezwaar bij het doceeren der Biologische wetenschapen, de Bacteriologie niet uitgezonderd. Kunnen er nu zeer veel uren aan de behandeling der stof besteed worden, dan komen de leerlingen ten slotte toch in het bezit van een toereikend feitenmateriaal om zelfstandig te oordeelen. Maar als ook dit niet het geval is, dan is van de colleges niet veel vrucht te verwachten. Gelukkig geldt het echter ook hier, dat het er minder om te doen is om kennis te verzamelen, dan wel om zich de geschiktheid daartoe eigen te maken, en dat deze geschiktheid veel beter is te verkrijgen door laboratoriumwerk dan op de colleges. Vandaar dat op Biologisch gebied de praktische oefeningen op zoo gelukkige wijze te hulp kunnen komen. Zeer in het bijzonder nu is dit alles van toepassing ten opzichte van de Technische Mikroskopie.

Op een college behoort deze als zoodanig natuurlijk in 't geheel niet thuis, omdat de verschillende daaraan ten grondslag liggende wetenschappen, — grootendeels biologische, — eigenlijk ieder voor zich een zelfstandig college zouden vereischen, waarvoor de tijd ontbreekt. Nu dient hieruit, weliswaar ook wat de oefeningen betreft, een keus gedaan te worden, maar tot het karakter der praktische oefeningen behoort juist, dat daarbij het scherpe verschil tusschen de wetenschappen gedeeltelijk vervalt, zoodat bijbedoelingen bijv. het nut, die keus mede kunnen bepalen.

In verband met het voorgaande wil ik nu de volgende vraag trachten te beantwoorden. Welke is de beste voorbereiding, om later, als het praktische leven zal zijn gekomen, handig, vlug en zeker het mikroskop te gebruiken, voor de beantwoording van de uiterst veelzijdige vragen, die door een ervaren onderzoeker daarmede kunnen worden opgelost?

Ik weet, dat het antwoord op deze vraag verschillend kan zijn, omdat daarbij steeds neiging bestaat de leerschool, welke men zelve doorloopen heeft te overschatten. En toch geloof ik niet, dat het alleen daardoor komt, dat ik voor mij zelf omtrent dit punt geen oogenblik in twijfel ben. Ik ben botanist en het is mijn stellige meening, dat de planten-anatomie en een deel der plantenphysiologie de praktische leerschool moeten zijn voor den technischen mikroskopist. Mocht de tijd voor een college beschikbaar zijn, dan zou het over dit vak moeten loopen, maar ik ben van oordeel, dat het laboratoriumwerk alleen voldoende is, ja, om de redenen welke ik boven uiteen zette, verreweg de voorkeur boven colleges verdient. Niet het geheugen, maar het waarnemingsvermogen en het nadenken moeten hier geoefend worden en dat kan het beste in de praktische lessen worden bereikt. Ik geloof dan ook, dat ik niet alleen sta in mijn opvatting omtrent de beteekenis, welke hierbij aan de botanie moet worden toegekend. Want spelen niet in den handel en in de industrie de waren, welke aan het plantenrijk ontleend zijn bijna overal een hoofdrol? Levensmiddelen, looimaterialen, verfplanten, vezelstoffen, houtsoorten, — zij kunnen bij dozijnen opgesomd worden. En heb ik niet dubbel recht om hier ter plaatse zoo te spreken, wanner wij bedenken, dat de tijd zeker niet ver meer is, wanneer de toepassing van het mikroskoop op de materialen, van de levenlooze wereld afkomstig, in het Mikrochemisch Laboratorium der P S. den triomftocht zal voortzetten, welke de krachtdadige bouwmeester der Mikrochemie daaraan heeft weten te verzekeren?

Ik verkeer in het aangename geval, dat de Nederlandsche Regeering bij de stichting van dit Laboratorium mijn meening heeft overgenomen. Er is aan deze inrichting een proeftuin verbonden, niet al te omvangrijk, en ook niet te klein. Tech-

nisch belangrijke planten kunnen daarin in overvloed gekweekt worden, en zoodoende zal hier na weinige jaren een uitmuntende basis voor de technische mikroskopie aanwezig kunnen zijn. Ja reeds op dit oogenblik is er heel wat in voorhanden, dat ons dienen kan. Een plantenkas, bestemd voor proefnemingen op Bacteriologisch gebied, en een lokaliteit voor het aanleggen van een collectie spiritus- en droogpreparaten, geschikt voor het onderwijs tijdens de wintermaanden, verhoogen de waarde van den tuin. Oook deze aanhangselen van het laboratorium en den tuin zijn niet overdreven groot, maar naar mijn meening beknopt, flink ingericht en juist voldoende voor hun tegenwoordige bestemming.

Ik kom thans tot de beschouwing van het tweede en verreweg het voornaamste gedeelte van de taak, welke het Bacteriologisch Laboratorium te vervullen heeft, nl. tot het Bacteriologisch Onderzoek en het Bacteriologisch Onderwijs.

Ik noem hier in de eerste plaats Onderzoek en eerst in de tweede het Onderwijs. Ik word daartoe gedwongen niet alleen door de veel hoogere beteekenis, welke ik persoonlijk aan onderzoek toeken, maar in ons bijzonder geval ook door den tegenwoordigen toestand onzer uit een praktisch oogpunt zoo uiterst belangrijke wetenschap. Wat namelijk het deel daarvan betreft, dat hier onderwezen en beoefend behoort te worden, zijn de tot nu toe bestaande leer- en handboeken niet geschikt om als leiddraad bij een praktischen onderwijs-cursus gebruikt te worden, en zelfs de tijdschriften bieden daarvoor nog slechts een weinig volledig en onvolkomen doorgewerkt ruwmateriaal aan; overal is een voorafgaand zelfstandig onderzoek noodig, om aan de proefnemingen op dit gebied dien graad van zekerheid te verschaffen, welke aanwezig moet zijn, om voor den beginner werkelijk leerzame en duidelijke resultaten te verkrijgen. De verhoudingen zijn hier geheel anders als bij de technische mikroskopie, waarbij de hulpwetenschappen kant en klaar zijn en door tallooze hoofden en handen voor praktisch onderwijs in elke gewenschte richting zijn doorgedacht en doorgewerkt, even als bij de schei- en natuurkunde, waarvan de wetenschappelijke inhoud, ook een hooge graad van paedagogische voortreffelijkheid bereikt heeft. Het is zeer opmerkelijk, dat niettegenstaande deze omstandigheid, welke uit het onderwijsoogpunt nogal zwaarwegend schijnt te zijn, toch juist de Bacteriologie het is geweest, welke tot de oprichting van dit laboratorium heeft geleid, en het is een eigenaardig teeken van de verandering, welke in den geest der tijden begint door te dringen, dat zelfs bij het onderwijs veel minder dan vroeger op de esthetische en theoretische voleindiging van een leervak gelet wordt dan op het werkelijke nut daarvan voor de samenleving. En zoo is het gekomen dat de Algemeene Bacteriologie, nog weinig geschikt voor een systematischen leercursus, toch op den voorgrond is getreden bij het opstellen der eischen, waaraan deze inrichting moest voldoen. Hierbij kon dus de belangrijke taak om onze jonge wetenschap voor een praktischen leerkursus geschikter te maken, op den voorgrond treden, en het is mijn hoop daarin langzamerhand te zullen slagen, waarvoor echter nog heel wat waarnemingen en onderzoekingen zullen vereischt worden. Bij de oprichting van dit laboratorium is met deze omstandigheden rekening gehouden door het afzonderlijk inrichten van afdeelingen voor onderzoek en onderwijs.

Zoodoende is door de Nederlandsche regeering een stap gedaan, in de naar mijn oordeel meer en meer noodzakelijk wordende richting om aan het wetenschappelijk onderzoek meerder zelfstandigheid te geven naast het onderwijs, een om-

standigheid, welke ik met groote voldoening erken en waardeer. Het schijnt mij toe, dat het vertrouwen in de juistheid der hier getroffen maatregelen nog toe zal nemen, wanneer bedacht wordt, dat zij zijn uitgevoerd onder het bestuur van buitengewoon bekwame ministers, die ook in andere opzichten blijken hebben gegeven van goed doorzicht in de veranderde eischen der samenleving.

De eigenlijke richting van ons laboratorium is natuurlijk niet gelegen op medisch gebied. Niet de zieke mensch met al zijn ellende en kwalen zal ons bezighouden, maar wij zullen in de eerste plaats handelen over en voor de belangen van den gezonden, krachtigen man, die in zijn leven iets hoopt tot stand te brengen. Het streven van het laboratorium zal zijn juiste denkbeelden te verspreiden, en zoo mogelijk verder te ontwikkelen en te verdiepen, aangaande bouw en eigenschappen van de levende stof in het algemeen en van de directe produkten daarvan. Ons arbeidsveld zal daarbij gelegen zijn op het gebied van de mikroben, dat is van de lagere mikroskopische organismen, waarbij de meer elementaire krachten van het leven, gescheiden uit het hoogst ingewikkelde verband, waarin zij ons bij de hoogere vormen bekend worden, zich voor nauwkeurig en betrekkelijk eenvoudig onderzoek bijzonder goed leenen [1]). Ook zonder omvangrijke kennis van de struktuur en de orgaanverrichtingen der hoogere dieren, zal het ons daardoor mogelijk worden, heldere inzichten te verwerven aangaande de krachten van het leven in onze omgeving.

Onze studiën zullen hoofdzakelijk betrekking hebben op de zoogenaamde saprophytische wezens, dat is op de bewoners van organische stoffen van den meest verschillenden aard, veel minder daarentegen op de parasieten en de pathogene mikroben, dat zijn de bewoners van andere levende wezens, welke meer behooren tot het terrein van de botanie, de zoölogie, de medische en de hygiënische wetenschappen. Niet dat wij de laatste hier geheel zullen verwaarloozen, dit zou reeds daarom onlogisch zijn, omdat bijv. vele der meest belangrijke parasieten, van het menschelijk lichaam, ook daarbuiten kunnen bestaan en in zekere gevallen dan als saprophyten voortleven. Met zekerheid geldt dit bijv. van de bacteriën, welke cholera en typhus veroorzaken, en van verschillende andere ziektekiemen, waarvan het voorkomen, en wat de cholerabacterie betreft, zelfs het voortbestaan en de vermenigvuldiging in sterk verontreinigde wateren is aangetoond. Maar daarmede komen wij op het gebied der hygiéne, die toch nimmer tot het hoofddoel van dit laboratorium zal kunnen worden. Zij is bovendien in hare algemeenheid aan onze universiteiten door leerstoelen vertegenwoordigd, zoodat hier alleen met die onderdeelen ervan, welke voor de industrie en het praktische leven belangrijk zijn, rekening zal moeten gehouden worden. Voor ons zullen van bijzonder gewicht zijn alle die mikroben, welke ons het beste in staat stellen de eigenschappen der levende cellen op de duidelijkste en meest veelzijdige wijze te leeren kennen, en verder alle die levensvormen, welke den industrieel en den chemicus bijzonder belang inboezemen, hetzij door de ingrijpende omzettingen, welke zij in de organische en anorganische stoffen, waarin zij leven teweeg brengen, hetzij door wat zij daarvan vernietigen of daaruit voortbrengen. Wij zullen de middelen leeren kennen om de schuilhoeken dezer wezens op eenvoudige wijze zichtbaar

[1]) Aan dit deel der biologische wetenschap geeft men tegenwoordig den naam van Mikrobiologie.

te maken, en trachten, waar dit tot nu toe niet gelukt is, door zelfstandig onderzoek verder te komen.

Reeds hebben deze studien tot een buitengewone verruiming van onzen blik op de werkingen van het organische leven aanleiding gegeven. In tal van gevallen waar vroegere geleerden slechts meenden te moeten denken aan zuiver chemische omzettingen, is het gebleken, dat levende mikroben de werkzame factoren zijn, waardoor evenzoovele onzekere en vage beschouwingen uit de wetenschap zijn verdwenen. Zonderlinge wezens zijn daarbij bekend geworden, wier levensvoorwaarden zeer verschillen van de schematische voorstellingen, welke de vroegere wetenschap zich aangaande de krachten van het leven meende te moeten vormen. Laat ik dit nog door een paar voorbeelden toelichten.

Ik kies daartoe in de eerste plaats organismen, welke een hoofdrol spelen bij den akkerbouw. Onder de vele soorten, die daarbij ongetwijfeld belangrijk zijn, is het vooral één groep waarvan de beteekenis en het groote nut met bijzondere duidelijkheid zijn bekend geworden. Ik bedoel hier de bacteriën van de zoogenoemde nitrificatie, dat is van den overgang van de ammoniumzouten van den bodem in salpeterzure zouten. Dit is gebleken een der hoofdprocessen te zijn, waarop het vruchtbaar worden van de akkers berust. Het hierbij betrokken chemisme omvat twee phasen. De eerste dezer phasen is de overgang van ammoniak in salpeterig zuur, de tweede, die van salpeterigzure zouten in nitraten. Aan deze beide phasen beantwoorden bijzondere mikroben; de oxydatie van de ammoniakzouten tot nitrieten wordt bezorgd door de nitrietmonade, de oxydatie van het nitriet tot nitraat door de nitraatbacterie. Beide organismen zijn letterlijk overal in de meer oppervlakkige lagen van den grond en daarbij in zeer groot aantal aanwezig. Zoo telde ik in een cub. centim. aarde uit een tuin te Delft 13000 nitrietmonaden.

Chemische processen als de hier genoemde zijn op zich zelve beschouwd reeds zeer merkwaardig, en zij worden dit in buitengewone mate, wanneer zij aan het leven moeten worden toegeschreven.

Maar de hoofdreden waarom de hierbij werkzame organismen zoo bijzonder belangwekkend zijn is daarin gelegen, dat zij geheel anders dan de overgroote meerderheid hunner verwanten, zich alleen dan ontwikkelen en alleen dan hun bijzondere chemische functiën uitoefenen, wanneer alles, wat naar organisch voedsel zweemt, zooveel mogelijk verwijderd is. Leidingswater met een weinig kaliumphosphaat en een ammoniakzout en geïnfecteerd met een spoor tuingrond is daarom bijzonder geschikt voor hun ontwikkeling en dientengevolge voor nitrificatie. Intusschen hebben nauwkeurige onderzoekingen mij geleerd, dat sporen van organisch voedsel ook hier niet mogen ontbreken, en dat de tegenwoordig heerschende meening, volgens welke de nitriet- en de nitraatmikroben hun koolstofbehoefte uit het koolzuur van de lucht zouden kunnen dekken, onjuist is.

Een ander voorbeeld.

Een der eerste praktische proeven, welke door U in het Bacteriologisch Laboratorium zullen gedaan worden, is het opkweeken uit het stof onzer omgeving, of uit de aarde van wegen en tuinen, van organismen wier kiemen zelfs tegen kookhitte van water bestand zijn en dientengevolge in levenden toestand in gekookte spijzen en dranken, welke op gewone wijze zijn toebereid, kunnen voorkomen. Door deze onverwachte, en in vergelijking met de overige levende wereld geheel afwijkende ver-

houding, zijn zij eénmaal de hoofdaanleiding geweest tot een langdurigen strijd tusschen verschillende natuuronderzoekers. De meesten daarvan beweerden dat, daar het in duizende gevallen met de meest verschillende schepselen proefondervindelijk was aangetoond, dat het kookpunt daarvoor doodelijk is, wel met beslistheid moest worden aangenomen, dat dit een natuurwet zonder uitzondering moest zijn, en men wees daarbij gaarne op de coagulatie-temperatuur van het eiwit, dat is van de chemische stof, die in de organische wezens zoo algemeen verspreid is, welke coagulatie-temperatur ver onder het kookpunt van water is gelegen. Boven de temperatuur waarbij het eiwit, — de chemische grondslag van het leven, — van natuur is veranderd, moet het leven zelve, zoo zeide men, à priori als onbestaanbaar beschouwd worden. Veel eenvoudiger scheen het dezen geleerden toe om aan te nemen, dat in gekookte vloeistoffen waarin toch levende wezens zichtbaar worden, deze door generatio spontanea of »oervoortbrenging«, dat is door een chemische omzetting van de organische stof zelve in levende stof, zouden kunnen ontstaan. Zij beriepen zich daarbij op het feit, dat bij den groei het opgenomen voedsel toch ten slotte ook in levend materiaal verandert, en beweerden daarom dat de logica verplicht in de spontane generatie niets anders te zien dan de continuïteit van de ontwijfelbare processen van voeding en groei [1]). In den anderen kamp schaarden zich de weinigen die aannamen, dat in gekookte vloeistoffen, waarin zich toch levende wezens ontwikkelen, kiemen moesten aanwezig zijn, welke kookhitte kunnen verdragen en dat de nieuwere, door Bastian in Engeland, door Pasteur in Frankrijk en door Cohn in Duitschland genomen proeven met zekerheid bewezen, dat zoodanige kiemen bestonden. Zij waren echter genoodzaakt hierbij tevens aan te nemen, dat zulke resistente kiemen uiterst algemeen verspreid moeten zijn, en zoowel in het zonnestof van den dampkring, als in de onzuiverheden van het glaswerk en in de onderzochte organische stoffen zelve is zeer groot getal moeten voorkomen. Hoe onwaarschijnlijk dit aanvankelijk ook mocht schijnen, de ondervinding heeft met zekerheid geleerd, dat het werkelijk zoo is, en het zal U verrassend gemakkelijk vallen, om in dezen kamp partij te kiezen, — verassend gemakkelijk met het oog op de te nemen proeven en bedenkende hoeveel eeuwen er zijn verloopen eer deze, ook uit het praktische oogpunt zoo gewichtige ervaring, tot klaarheid is gekomen.

Met behulp van de bacteriologische kultuurmethoden en onder voortdurende contrôle van het mikroskoop, zal het U blijken, dat deze kiemen niet alleen uiterst algemeen zijn, maar dat zij behooren tot een groot aantal soorten van zeer verschillende organismen, waaronder bijv. vele van de voor het dagelijksch leven zoo hoogst belangrijke bacteriën welke de rotting van eiwitachtige stoffen veroorzaken. Zij zijn de spil, waarom alle vragen, welke op het conserveeren van voedingsmiddelen betrekking hebben, zich bewegen. Zij zijn het die voor den natuuronderzoeker het zonnestofje, waardoor de lichtstraal in een donkere kamer zichtbaar wordt, even belangwekkend hebben gemaakt als die lichtstraal zelve.

---

[1]) Zoo besluit bijv. Bastian zijn boek »*Evolution and the Origin of Life*«, met de volgende schoon klinkende woorden: »Meanwhile let none forget that . . we may as reasonably doubt the fact that Living Matter grows, as we may doubt the fact that it can arise independently, — and further, that Origin and Growth are in essence merely stages of one and the same process.«

Gaarne zou ik u nog andere gevallen van onverwachte levensvoorwaarden van mikroben willen noemen dan de twee beschouwde, maar thans ontbreekt daarvoor de tijd. Het is bovendien niet alleen door zulke eigenschappen, dat de mikroben ons tot verdere proefneming uitlokken, of laat ik liever zeggen noodzaken, zij doen dit niet minder door hunne verre verspreiding en hun verbazend aantal. Zoo is bijv. de genoemde, bij kookhitte resistente groep, naar het soorten-aantal slechts een klein onderdeel van de onzichtbare organische wereld, die wèl door kookhitte wordt vernietigd en evenzeer gevonden wordt, zoowel in het zonnestof van de atmosfeer, als in het stof, dat alle voorwerpen van dagelijksch gebruik bedekt, zooals meubels, kleeren, huisraad, boeken, — zoowel in het slijk en zand van straten en wegen, als in den grond van bosschen en velden. Voeg daarbij nog een tallooze menigte van mikroskopische wezens, welke aan de zee en de binnenwateren eigen zijn, verder de rijke flora's van de meeste voedingsmiddelen, eindelijk, die van de vele organische stoffen, welke in de natuur aan zichzelf overgelaten, de prooi worden van bijna voor elke stof eigendommelijke soorten en die het bekende gezegde tot waarheid maken: »rien n'est proie de la mort tout est proie de la vie«, dan kunt gij U eenig denkbeeld vormen van de verscheidenheid en de veelheid der levende wezens, welke in het Bacteriologisch Laboratorium het voorwerp van onderzoek en studie zullen uitmaken.

Alle Bacteriologische proeven ontleenen een eigenaardig karakter aan den aard der voorzorgen, waarvan hun welslagen afhankelijk is, en zij vormen daardoor een oefenschool voor den geest, welke op gelijke lijn moet gesteld worden met die, welke het praktisch onderzoek op het gebied der schei- en natuurkunde verschaft. Deze voorzorgen zijn gewoonlijk eenvoudig, vaak zelfs nietig en klein, maar zij vereischen aanhoudende aandacht en opmerkzaamheid en een zekere fijnheid in het manipuleeren, die den beoefenaar langzamerhand tot een goed waarnemer kan maken. Ook dit wil ik door een voorbeeld toelichten.

Bederf, gisting, rotting zijn processen, welke in plantensappen of in extrakten van dierlijke zelfstandigheden door levende mikroben worden teweeggebracht en hier vooral meende men de duidelijkste bewijzen te vinden voor den direkten overgang van het plantaardige of dierlijke eiwit, in de bederfkiemen, dat is van de spontane generatie, waarover ik reeds gesproken heb en waarop ik thans in ander verband weder terugkom.

Pasteur toonde aan, dat de voorstanders van deze hypothese bij hun proeven nog een geheel andere en veel meer voor de hand liggende fout hadden gemaakt, dan hun bovengenoemde vergissing omtrent het vermeende niet bestaan van tegen kookhitte bestand zijnde levende wezens. Zij hadden een voorzorgsmaatregel verwaarloosd, welke zoo nietig en eenvoudig schijnt, dat men zich eigenlijk niet genoeg verwonderen kan, waarom eerst een Pasteur in staat geweest is om daarop te wijzen en voort te bouwen.

Wat hier verwaarloosd was is het volgende.

Men had verzuimd maatregelen te nemen om de bederfkiemen, welke wellicht van uit de omgeving in de onderzochte materialen konden overgaan, buiten te sluiten. Pasteur bereikte dit doel door een hoogst eenvoudige voorzorg: hij plaatste een watteprop in den hals der kolven, waarmede hij zijn proeven deed om aan 't stof uit de lucht den toegang te beletten, zonder de lucht zelve af te sluiten. Hiertoe bepaalde hij zich echter niet alleen, ook anderen hadden dit reeds vóór hem gedaan, zonder

tot een beslissend resultaat te komen. Maar hij plaatste die watteprop op zijn kolven en kultuurapparaten op een oogenblik, dat de inwendige glaswand daarvan, nog onmogelijk bezaaid kon zijn, met vroeger uit de lucht of op andere wijze daarop gevallen of gebrachte kiemen, wel inziende dat het onverschillig is of de bederfkiemen tijdens de proefneming of reeds eer deze begon gelegenheid vonden om toe te treden, en juist dit was door zijn voorgangers verwaarloosd. Hij bereikte zijn doel door het glaswerk vooraf sterk te verhitten, waardoor alle daaraan gehechte levende kiemen verbrand worden. Zoodoende werd Pasteur de uitvinder van de stofwerende afsluitingen en de ontdekker van de noodzakelijkheid om het glaswerk vóór elke bacteriologische proef vooraf te sterilisieeren, — dat is de naam, welke men tegenwoordig aan het vernietigen van de levende kiemen geeft. Deze en vele andere overeenkomstige later in toepassing gebrachte maatregelen had ik op 't oog toen ik U sprak van de fijnheid in het manipuleeren, voor onze onderzoekingen vereischt.

Maar is het niet tevens een getuigenis voor de onbegrensde gevolgtrekkingen, waartoe experimenteele wetenschappen kunnen voeren, dat de scherpe formuleering van de twee karakteristieke vragen: »Hebt gij het glaswerk voor uw proeven gesteriliseerd«? en »Hebt gij bij uw proeven voor de afsluiting van de kiemen uit de omgeving zorg gedragen«? dat deze beide vragen een volledige omkeer, niet alleen in de geneeskunde en de hygiëne, maar zelfs in onze algemeene opvattingen over de eigenschappen van het organische leven hebben kunnen teweegbrengen, en dat, door de consequente toepassing dezer proefondervindelijke gegevens in de laboratoriën een nieuwe reeks van overwinningen van de biologische wetenschap ten nutte van het praktische leven is begonnen? Voorwaar een grootsch resultaat van eenvoudige voorzorgsmaatregelen en een groote aanmoediging om hoopvol de resultaten van toekomstige proefneming te gemoet te zien.

Voor het welslagen van elk experiment op bacteriologisch gebied, hoe bescheiden de daarvan verwachte uitkomsten ook wezen mogen, zijn zoodanige schijnbaar nietige voorzorgen en overwegingen essentieel, waarvan ten slotte nog een enkel voorbeeld. Gesteld, men wenscht een bacteriologisch wateronderzoek te doen. Het eerste wat daarbij gewoonlijk wordt vastgesteld is het aantal bacteriën per cub. centim. water. Dit geschiedt door het water te brengen in of op een vast voedingsmateriaal, geschikt om de aanwezige bacteriën ter plaatse waar zij te land komen, niet alleen vast te houden, maar door voeding tot zoodanige vermenigvuldiging te brengen, dat zij zich tot koloniën ontwikkelen, dat ist tot uit vele duizende individuen bestaande groepen, welke met het ongewapend oog kunnen waargenomen en geteld worden. Maar wat leert nu de ondervinding? Zij leert, dat de geringste verschillen, welke in den aard van den voedingsbodem voorkomen, zich afspiegelen in het aantal bacteriën, welke op die wijze per cub. centim. water worden gevonden. Zoo zal een verschil in het alkaligehalte van den voedingsbodem, beantwoordende aan bijv. $^1/_{10}$ cM.^{3} normale loog per honderd cM.^{3} van het voedsel een enormen invloed op het gevonden aantal bacteriën kunnen uitoefenen. Zeer geringe verschillen in de concentratie van zekere andere stoffen bijv. zouten, waardoor de osmotische spanning van den voedingsbodem veranderd wordt, zullen op overeenkomstige wijze werken. Ook temperatuursveranderingen in het onderzochte watermonster, de tijd gedurende welke het werd bewaard, zelfs de lichtinsolatie waaraan het was blootgesteld, kunnen groote verschillen in het resultaat teweegbrengen. Voor den bioloog sprak het volstrekt niet van zelve, dat deze

en dergelijke omstandigheden op het anders zoo elastische leven van overwegenden invloed zouden kunnen wezen.

Ik heb dit voorbeeld uitgekozen omdat de eenvoudigheid der proef en hare praktische belangrijkheid voor de beoordeeling van de werkzaamheid der zandfilters, aanleiding hebben gegeven om deze methode van wateronderzoek in zeer vele gevallen toe te passen. Toch heeft het jaren geduurd eer de beteekenis daarvan ten volle begrepen is, en langen tijd werden er praktici gevonden, die hun geringschatting niet verborgen. Er was daarvoor vroeger reden genoeg, want het consequent doorvoeren van schijnbar nietige voorzorgen is moeielijk en verd aanvankelijk niet genoeg als essentieel beschouwd, waardoor de verkregen uitkomsten vaak werkelijk waardeloos waren. Eerst door het algemeen worden van de praktische cursussen, welke door goed onderrichtte geleerden in de hygiënische laboratoriën geleid werden, verbeterde de logische toepassing der noodzakelijke voorzorgsmaatregelen en daarmede de waarde der proefnemingen. De praktici hebben opgehouden te glimlachen, bemerkende dat zij zelve belachelijk werden, en er zijn tegenwoordig op vele plaatsen kleinere of grootere onderzoekingsstations ontstaan, in hoofdzaak of uitsluitend voor bacteriologisch wateronderzoek ingericht.

Ik heb U in den aanvang op de moeielijkheden van het kort en bondig doceeren der Bacteriologie door middel van colleges gewezen. Ik wees U het laatste op het eigenaardige karakter der proefnemingen op dit gebied en het zal U niet ontgaan, dat ook daarin een nieuw bezwaar voor een beknopte voordracht is gelegen. Maar al die essentieele kleinigheden, welke in een voordracht geen plaats vinden, komen bij de praktische oefeningen als het ware van zelf tot hun recht, en de gelegenheid tot het volgen daarvan is thans aan de P. S. voor goed geopend.

Mijne Heeren Studenten! Ik ben hiermede voor dit uur aan 't einde mijner beschouwingen gekomen. De aanvankelijk gestelde vragen aangaande aard en bedoeling van deze inrichting en van het hier te geven onderwijs, heb ik in eenige breede trekken en door enkele beppaalde voorbeelden trachten te beantwoorden en toe te lichten. Dit Laboratorium is thans het Uwe. Daar het als waarschijnlik moet worden beschouwd, dat de tijd voor de oprichting ervan nog niet gerijpt zou zijn, indien wij niet konden voortbouwen op den vasten grondslag, welke door Pasteur aan de Mikrobiologie gegeven is, wensch ik zijn naam op dit oogenblik niet te vergeten, en hoezeer onder omstandigheden gebezigd, waarbij niet alleen aan den studietijd maar ook aan het latere leven moest worden gedacht, zoo komt het mij toch, of wellicht juister gezegd, daarom voor, dat ik onze inrichting niet beter kan inwijden dan door de volgende woorden, waarmede hij bij gelegenheid van zijn zeventigjarig jubelfeest de Fransche studenten heeft toegesproken, eenigszins gewijzigd tot de mijne te maken en thans tot U te richten. — Vertrouwt u toe aan den dienst der waarheid en aan het onderzoek der natuur, gelijk U die in de laboratoriën worden geleerd. Vertrouwt U toe aan de zekere, aan de machtige methoden van de proefneming, waarvan alleen de eerste geheimen ons tot nu toe bekend zijn geworden, en die zich heeft doen kennen als een krachtige hefboom van de beschaving en van de materieele welvaart der volken. En Gij allen, welke ook Uw levensloop moge worden, laat U niet bereiken door een dwaas en nutteloos scepticisme; laat U niet ontmoedigen door de tegenspoeden en teleurstellingen, welke zekere uren ongetwijfeld ook over U zullen brengen. Leeft en arbeidt in den reinen vrede van de werkplaatsen en de bibliotheken. Vraagt U

zelven allereerst af: Wat heb ik gedaan voor mijne wetenschappelijke vorming? En daarna, wanneer Gij in 't leven zult vorderen: Wat heb ik gedaan voor mijne omgeving en voor mijn vaderland? Tot dat het oogenblik zal gekomen zijn, dat Gij wellicht het groote geluk zult hebben van te mogen denken iets te kunnen bijdragen tot den vooruitgang en het welzijn der menschheid. Maar hetzij dat Uw pogingen meer of minder door het noodlot begunstigd worden, Gij behoort, wanneer het eind van Uw loopbaan begint te naderen, het recht te hebben om te zeggen: ik heb gedaan wat ik kon.

Emulsions- und Sedimentfiguren bei beweglichen Bakterien.

Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde, Jena, II. Abteilung, III. Band, 1897, S. 1—6.

1. Erzeugung und Natur der Figuren.

Die meisten beweglichen Bakterien haben die folgende Eigenschaft: In dünnen Schichten ihrer Nährlösungen reichlich angehäuft bilden sie, beim ruhigen Stehen, im Verlaufe einiger Minuten eigentümliche Ansammlungen.

Diese bestehen entweder aus säulen- oder leistenförmigen, quer durch die Dicke der Flüssigkeit (von oben nach unten) verlaufenden, oder plattenförmigen, zu Boden liegenden scharf begrenzten Gruppen, welche voneinander durch eine bakterienarme oder bakterienfreie Flüssigkeit getrennt sind.

Die leisten- und säulenförmigen Ansammlungen will ich als Emulsionsfiguren, die plattenförmigen als Sedimentfiguren bezeichnen; prinzipiell handelt es sich dabei jedoch um identische Verhältnisse. Eine genaue Untersuchung lehrt nämlich, daß Säulchen und Leisten in den Emulsionsfiguren schon bald nach ihrer Entstehung eine breite Basis besitzen (vergl. den Holzschnitt), welche sich allmählich vergrößert durch Herabsinken der Bakterien aus den Säulchen, derweise, daß letztere schließlich gänzlich verschwinden und die Sedimentfiguren sozusagen Limite der Emulsionsfiguren werden. Unter Umständen kann dieses Herabsinken jedoch viele Stunden auf sich warten lassen. Die Entfernung zwischen den Spitzen zweier benachbarten Säulchen beträgt ca. $^3/_4$—1 mm, kann jedoch bis zu 2 mm und mehr steigen. Zwischen den Sedimentplatten ist die Entfernung gewöhnlich kleiner. Je mehr Bakterien, desto kleiner alle Dimensionen.

Die Emulsionsfiguren entstehen am besten in etwas dickflüssigen Medien, z. B. in verflüssigten Gelatinekulturen, die Sedimentfiguren leichter in dünnen Nährlösungen, wie Fleischbouillon, doch spielen hierbei die spezifischen Eigenschaften der Bakterien eine Hauptrolle, und es giebt Arten, welche auch in Wasser kaum anderes als Säulchen und Leisten erzeugen. So erhielt ich bei Bacillus punctatus, B. perlibratus, Photobacterium Indicum vorzugsweise Sedimentfiguren, bei Bact. Zopfii nichts anderes wie Emulsionsfiguren, bei Bacterium Termo beide gleich leicht.

Nicht alle beweglichen Bakterien sind für die Erzeugung der Emulsionsfiguren gleich gut geeignet. Zwar spielen dabei Dauer und Intensität der Beweglichkeit, wie unten noch näher angegeben werden wird, eine Hauptrolle, jedoch kommen dabei auch Artmerkmale auf eine mir bisher nicht ganz klare Weise zum Ausdruck. So konnte ich mit Bacillus pyocyaneus viel schönere Figuren erhalten, wie mit

ebenso stark beweglichen Varietäten von B. fluorescens liquefaciens und B. fl. non liquefaciens. Cholera verhielt sich wie letztere Arten. Jedoch sind in allen diesen Fällen die Figuren kräftig genug entwickelt, um damit die unten zu nennenden Versuche auszuführen. Dagegen war es mir nicht möglich, bei B. cyanogenus überhaupt Emulsionsfiguren zu erhalten.

Für die Beobachtung der Emulsions- und Sedimentfiguren müssen die Schichten in Glasdosen mit gut geebnetem Boden gegossen und auf einen dunkelschwarzen Tisch gestellt bei günstiger Beleuchtung betrachtet werden. Der Entstehungsmodus der Figuren ist nicht mit unbewaffnetem Auge zu verfolgen, sondern erfordert eine 6- bis 10fach vergrößernde Lupe; obschon die dabei stattfindenden Vorgänge interessant sind, muß ich es unterlassen, hier alle Details zu besprechen. Für die Herstellung in chemotaktischer und osmotischer Hinsicht recht empfindlicher Figuren können nur sehr aktive Bakterien, d. h. junge, kräftig wachsende Kulturen verwendet werden, worin nur wenige sich nicht bewegende Individuen vorkommen. Die letzteren fallen inert zu Boden und trüben die Schönheit der Versuche. Bei den verflüssigenden Arten erhielt ich sehr empfindliche Emulsionsfiguren einfach durch Ausgießen der teilweise verflüssigten Kultur aus dem Reagentienröhrchen in eine flache Schale, vermischt oder nicht vermischt mit ein wenig Fleischbouillon, um der Schicht die nötige Dicke zu geben.

Junges Agarmaterial, welches für Versuche über Beweglichkeit und so auch für die Figurenbildung besonders empfehlenswert ist, bringt man in Wasser oder in Bouillon aufgerührt in die Glasschale. Solche Bouilloninfuse läßt man dann zunächst mehrere Stunden ruhig stehen, wobei in der dünnen Schicht ein kräftiges Wachstum stattfindet. Bei den verflüssigenden Leuchtbakterien soll Fischbouillon mit 3-proz. Kochsalz- oder Meereswasser zum Vermischen verwendet werden.

Die Schichten sollen nicht dicker wie 1 bis 2 mm sein, weil die Erscheinung in dickeren Schichten ihre Schärfe einbüßt. Sind die Schichten jedoch nur ca. ½ mm dick oder noch dünner, so bilden sich die Figuren nicht. Bei guter Versuchsanstellung sind die Figuren sehr scharf gezeichnet, besonders bei den wenig durchsichtigen Bakterien wie Bacterium Termo, weil hierbei die Ansammlungen mit trüblich-weißer Farbe gut kontrastieren zur schwarzen Farbe des Tisches, den man durch die Zwischenräume sieht. Die mehr durchsichtigen Arten, wie Bacillus perlibratus und Bacterium Zopfii sind schwieriger zu beobachten, dennoch für Versuche sehr geeignet. Am besten sind die Figuren mit einer großen, ca. zehnfach vergrößernden Lupe zu betrachten.

Schüttelt man die Flüssigkeit, so verschwindet die Emulsionsfigur plötzlich, um sich jedoch nach einer oder ein paar Minuten wieder zu bilden, und dieses Spiel kann man tagelang wiederholen; da jedoch nur die beweglichen Bakterien bei der Figurenbildung beteiligt sind und viele bewegungslos zu Boden sinken, geht die Schönheit der Erscheinung allmählich verloren, weil die Zwischenräume sich dann nach dem Umschütteln nicht mehr klären.

Die Erklärung der Erscheinung glaube ich wie folgt geben zu müssen: Die Emulsionsfiguren entstehen durch lokale Strömungen; in den Zwischenräumen steigt die mit Kohlensäure gesättigte Flüssigkeit nach oben, in den Säulchen fällt die mit Sauerstoff gesättigte Nährlösung nach unten. Eine schwache Verdunstung und kräftige Atmung müssen der Erscheinung deshalb förderlich sein, und thatsächlich wirkt

eine mäßige Erwärmung günstig. Läßt man ein Deckglas auf der Flüssigkeit treiben, so entsteht, wie zu erwarten war, die Emulsionsfigur darunter nicht, wenn Sauerstoffbedürfnis schon eintritt, bevor die Figur sich hat ausbilden können. Einmal gebildet und dann mit dem Deckglas überdeckt, kann sie sich aber auffallend lange halten, jedoch nur dann, wenn sie als Sedimentfigur zu Boden liegt; die aktiveren stäbchenförmigen Emulsionen verfließen unter dem Deckglas bald, doch verschwindet schließlich die Sedimentfigur ebenfalls vollständig. Daß meine eben gegebene Erklärung richtig ist, glaube ich daraus ableiten zu müssen, daß es möglich ist, mit gewissen unbeweglichen Mikroben Emulsionsfiguren zu erzeugen, welche denjenigen der beweglichen Bakterien ähnlich sind, wenn nur beachtet wird, daß die Mikrobien nahezu dasselbe spezifische Gewicht wie die Nährlösung besitzen und kräftig atmen müssen. Diese beiden Eigenschaften fand ich vereinigt in ziemlich konzentrierter Würze, welche mit Bierhefe in lebhafte Gärung versetzt wird. Wird die dünne Schicht nach dem Umschütteln in der Glasdose mit der Hand erwärmt und dann ruhig sich selbst überlassen, so sammeln die Hefezellen sich in kleinen Flecken an, welche allmählich zu Boden sinkend sich zu fünf-, sechs- und siebeneckigen Figuren abplatten, die voneinander durch hefefreie Würze getrennt sind. Dabei bemerkt man, daß die Kohlensäurebläschen eben in den Zwischenräumen frei kommen, ja oft zu Boden der Glasdosen zu polyëdrischen, den Zwischenräumen der Hefeflecke entsprechenden Figuren adhäriert bleiben. In diesem Falle ist es deshalb sicher, daß die sauerstoffhaltige Flüssigkeit oberhalb der Hefefelder nach unten sinkt. Die Felderung hält sich in der sedimentierten Hefe nur kurze Zeit und zu weiteren Versuchen konnte sie mir keine Veranlassung geben. Trotz vieler Versuche ist es mir noch nicht gelungen, leblose Körper zu finden, welche zur Bildung von Emulsionsfiguren, die mit denjenigen der beweglichen Bakterien vergleichbar sind, Veranlassung geben.

Wie man aus dieser Beschreibung bemerkt, sehe ich in meinen Emulsionsfiguren zunächst den Ausdruck physikalischer Verhältnisse. Daß die beweglichen Bakterien so eminent befähigt sind zu deren Erzeugung, beruht, wenigstens zum Teil, wohl auf der Natur ihrer Körperoberfläche, speziell auf der Gegenwart der Cilien, jedoch auch auf ihrer spezifischen Schwere, welche wenig von derjenigen ihrer Nährlösung verschieden ist; vielleicht auch noch auf anderen, mehr physikalischen Eigenschaften. Jedoch glaube ich annehmen zu müssen, daß besonders ihr Sauerstoffbedürfnis bei der Entstehung und Erhaltung der Emulsionsfigur beteiligt ist, und daß die Säulchen oder Platten als Atmungsfiguren [1]) aufgefaßt werden müssen, d. h. daß die Säulchen bei Bacterium Termo z. B., dessen Atmungsfigur zum Aërobientypus gehört, diejenigen Stellen bezeichnen, wo die Bakterien den meisten gelösten Sauerstoff vorfinden. Daß der Sauerstoff dabei eine Hauptrolle spielt, geht schon daraus hervor, daß unter einem Deckglas, welches auf der Flüssigkeit treibt, wenn es nur früh genug aufgelegt ist, wie gesagt, keine Emulsionsfiguren entstehen, offenbar, weil die Bakterien dann eben aus Sauerstoffbedürfnis nicht zur Ruhe kommen.

Sollte es gelingen, Emulsionsfiguren mit anaëroben Bakterien zu erzeugen, so wird darauf vielleicht noch mehr Licht fallen; bisher ist mir das jedoch nicht gelungen, obschon ich eben gegenwärtig eine mit Oedematis maligni verwandte Art kultiviere, welche für solche Versuche ganz geeignet erscheint.

---

[1]) Centralblatt für Bakteriologie, Abt. I, Bd. XIV, 1894, p. 827.

Aus der Literatur sind mir keine Beschreibungen bekannt geworden, welche ganz auf meine Emulsionsfiguren anwendbar sind. Nur die von Julius Sachs unter dem gleichen Namen beschriebenen Anordnungsfiguren der Zoosporen von Grünalgen haben damit einige Aehnlichkeit[1]). Sachs zeigt, daß die Gruppierungen der Zoosporen, welche sich an der Oberfläche des Wassers ausbilden, also ganz anders wie die Bakterienfiguren, durch Wärmeströmungen bedingt werden[2]) und sehr schön nachgeahmt werden können mit einer Emulsion von mit Alkanna rot gefärbtem Baumöl in einem Gemische von Alkohol und Wasser von gleichem spezifischen Gewicht. Mehr als eine entfernte Aehnlichkeit liegt hier jedoch nicht vor, und daß ich mich dennoch entschloß, den gleichen Namen für meine Figuren anzuwenden, war besonders deshalb, weil ich dadurch Nachdruck legen wollte auf die wichtige Rolle, welche physikalische Strömungen in der Flüssigkeit nach meiner Ansicht auch bei den Bakterienemulsionen spielen.

2. Beschreibung von Bacterium Termo.

Von den bisher darauf geprüften beweglichen Arten haben sich mehrere »Wasserbakterien« als besonders geeignet für die Erzeugung der Figuren ergeben. Eine der allgemeinsten davon wünsche ich als Bacterium Termo zu bezeichnen, weil sie gut übereinstimmt mit den älteren Beschreibungen und Abbildungen, welche unter diesem Namen veröffentlicht sind, während ich keine neuere Beschreibung kenne, welche darauf ganz paßt; vielleicht ist Bacillus punctatus Zimmermann[3]) davon nur eine Varietät. Da ich mit dieser Bakterie alle die im folgenden zu besprechenden Versuche ausgeführt habe, scheint es erwünscht, davon eine Diagnose vorauszuschicken:

Bacterium Termo. Kurzstäbchen, im Mittel 1½ μ lang, 1 μ breit mit abgerundeten Enden und einer einzigen endständigen Geißel (monotrich). Bisweilen längere Stäbchen. Immer sehr stark und lange ausdauernd beweglich, im mikroskopischen Präparate selbst noch dann, wenn die Luft ¼ Stunde und länger abgeschlossen ist. Atmungsfigur[4]) sehr prononcierter Aërobientypus mit breitem bakterienfreiem Felde[5]).

Wachstum temporär anaërobisch[6]). In tiefen Fleischbouillongelatineschichten,

---

[1]) Flora 1876, p. 262, und Gesammelte Abhandlungen über Pflanzenphysiologie, Bd. I, p. 145.

[2]) Dieser Erklärung ist zwar widersprochen (Berthold, Photoplasmamechanik 1886, p. 113), doch halte ich dieselbe für richtig.

[3]) Bakterien der Chemnitzer Wasserleitung, Tl. I, p. 38, Chemnitz 1890. Der Name »punctatus« deutet eben auf die Leichtigkeit, womit diese Bakterie punktförmige Ansammlungen, d. h. Emulsionsfiguren erzeugt.

[4]) Centralbl. f. Bakt., 1. Abt., Bd. XIV, 1893, p. 839.

[5]) Die Breite des bakterienfreien Bandes oder Feldes in den Atmungsfiguren wird bedingt durch die Dauer der Beweglichkeit, womit diese Breite steigt und fällt.

[6]) Der Name »facultativ anaërobisch« ist verwerflich und soll durch »temporär anaërobisch« ersetzt werden, weil die sogenannten »facultativen« Anaërobien nur zeitweise ohne Sauerstoff wachsen können. Wenn es Bakterien gäbe, welche andauernd ebenso gut mit wie ohne Sauerstoff leben könnten, so wäre darauf der Name »permanent-fakultative Anaërobien« oder kurz »fakultative Anaërobien« anwendbar. Früher meinte

in Eprouvetten, viel Gas erzeugend. Auf Fleischagar entsteht das Gas schon in den gewöhnlichen Reagentienröhrenkulturen, sobald nur einzelne Bakterien zwischen Glas und Agar angelangt sind [1]). Das Gas ist ein Gemisch von Kohlensäure und Wasserstoff in veränderlichen Verhältnissen. Glukose, Lävulose, Maltose, Rohrzucker, Glycerin, Galactose, Mannit und Dextrin vergären besonders leicht, Lactose viel schwieriger, Raffinose und Calciumlactat überhaupt nicht.

Temperaturoptimum für das Wachstum zwischen 20 und 25° C; bei 30° C schon sehr stark geschädigt unter erblicher Wachstumsschwächung und veränderter Enzymbildung.

Sporenbildung findet nicht statt.

Nährgelatine wird stark und vollständig verflüssigt, wobei kaum stinkende Produkte entstehen; flüchtige Schwefelverbindungen nicht beobachtet. Indolbildung meistens sehr deutlich. Macht den Kulturboden schwach alkalisch.

Bacterium Termo findet sich allgemein auf untergetaucht lebenden Wasserpflanzen. Bringt man z. B. einen Zweig von Elodea canadensis oder Ceratophyllum in eine Reagentienröhre, übergießt mit Fleischpeptongelatine, bis der Zweig ganz untergetaucht ist und läßt erstarren, so wird man nach ein paar Tagen in der Tiefe da und dort an der Epidermis der Pflanze schnell verflüssigende Kolonieen entstehen sehen mit charakteristischer Gasentwicklung. In den von mir untersuchten Fällen fand ich bei dieser Versuchsanstellung, zu meiner Ueberraschung, meistens keine anderen Bakterienarten wie B. Termo auf den kräftigen Zweigen von Elodea canadensis im Juni). B. Termo überlebt Eintrocknen nicht und wurde nicht in Erde und Staub gefunden.

Solange ich mein Bact. Termo noch nicht genau mit Proteus vulgaris Hauser [2]) verglichen hatte, glaubte ich, beide könnten identisch sein. Das ist jedoch, wie aus meiner Beschreibung erhellt, durchaus nicht der Fall, denn Proteus vulgaris ist peritrich (d. h. über die ganze Körperoberfläche mit Geißeln besetzt), kaum beweglich, kein oder nur ein schwacher Gärungserreger und ein Sulfidbildner, welcher als spezifischer Fäulnisbewohner auftritt. Emulsionsfiguren erzeugt Proteus vulgaris in Uebereinstimmung mit seiner schwachen Beweglichkeit gar nicht.

Die Emulsionsfiguren von Bacterium Termo bestehen bei sehr aktiven Kulturen, d. h. wenn alle Individuen beweglich sind, aus feinen Säulchen [3]), welche entweder frei die Flüssigkeitsschicht durchqueren oder seitlich miteinander zu Platten und Rippen verbunden ein verzweigtes oder netzartig zusammenhängendes System erzeugen. Erst bei längerem Stehen sinken die Säulchen allmählich zu Boden, bleiben jedoch auch dann, ähnlich wie in § 1 beschrieben, durch eine bakterienarme Flüssigkeit seitlich voneinander getrennt und erzeugen eine Sedimentfigur. Da

---

ich, daß hierher die Milchsäurefermente der Gärungsindustrie gehörten, doch bin ich darüber wieder in Zweifel geraten und ich glaube gegenwärtig, daß eine solche Gruppe nicht existiert.

[1]) Fleischagar erzeugt bei Gärung ceteris paribus viel mehr Gas wie Fleischgelatine, offenbar durch Zuckerbildung aus dem Agar infolge der Präparation.

[2]) Bei Lehmann und Neumann, Bakteriologische Diagnostik, p. 243, München 1890, als Bacterium vulgare beschrieben. Mein Proteusmaterial erhielt ich durch die Güte des Herrn Král aus Prag. Es stammt vielleicht von Hauser's Originalkulturen.

[3]) Von obenauf gesehen, deshalb aus Punkten oder kleinen Zirkelflächen.

das Säulchenstadium für die fernere Versuchsanstellung am besten geeignet ist, soll man sich mit der Lupe überzeugen, daß dieses sich gebildet hat. Von oben gesehen zählte ich meistens 70—100 Säulchen pro qcm; die Dicke der Säulchen ist hier also viel dünner wie 1 mm. Bei B. punctatus und B. perlibratus sind die Säulchen dicker. Hat die Emulsionsfigur sich sehr ruhig gebildet, so können die Säulchen so regelmäßig angeordnet sein, daß die Figur einigermaßen an eine riesige Diatomeenschale erinnert. Jede Strömung während der Ausbildung, jedes Staubteilchen, welches auf die Flüssigkeit fällt, stört die Regelmäßigkeit der Anordnung, wobei gewöhnlich mehrere Säulchen seitlich miteinander verschmelzen und Plattensysteme erzeugen, welche auf allerlei komplizierte Weisen miteinander zusammenhängen. Werden die Ansammlungen dicker, so sind die Säulchen oft hohl, und bisweilen findet sich in der Höhlung eine zweite Ansammlung.

Indem ich nun zu einer näheren Betrachtung der Verhältnisse bei Bacterium Termo übergehe, welche sich durch die lange andauernde Beweglichkeit als ein besonders geeignetes Versuchsmaterial herausgestellt hat, wünsche ich noch vorher zu bemerken, daß ich aus Wasser und Erde noch mehrere andere ebenso vorzügliche Bakterienarten isoliert habe, doch glaube ich, daß Bacterium Termo besonders leicht aus der freien Natur in die Hände der Bakteriologen kommen [1]) und am ehesten zur Wiederholung der einfachen und lohnenden Versuche veranlassen wird.

3. Durch Strömungen bedingte Veränderungen in den Figuren.

Daß ein so zartes Gebilde wie ein aus in Flüssigkeit schwebenden Säulchen gebildetes Netz, dessen Bausteine bewegliche Baktrien sind, ein empfindliches Reactiv auf gewisse Aenderungen im umgebenden Medium sein konnte, war zu erwarten. Meine Hoffnung, darin makroskopsich sichtbare tonotaktische [2]) und chemotaktische Wirkungen erzeugen zu können, hat sich jedoch nur teilweise verwirklicht, was hauptsächlich mit den eigentümlichen Verwandlungen zusammenhängt, welche die Figuren durch Strömungen in der Flüssigkeit infolge der Konzentrationsänderung erfahren, und welche die tonotaktischen und chemotaktischen Erscheinungen mehr oder weniger verdecken. So viel steht aber fest, daß in genügend aktiven Emulsionsfiguren Tonotaxis und Chemotaxis sicherlich unter Umständen beobachtet werden können.

Allein wenn es gelingen sollte, den Einfluß der Strömungen auf die Figuren gänzlich zu beseitigen, auch dann würden noch nicht alle Schwierigkeiten überwunden sein zur richtigen Beurteilung der tonotaktischen und chemotaktischen Vorgänge, denn dieselben treten unter Umständen, trotz der Strömungen mit genügender Deutlichkeit hervor, um zu beweisen, daß diejenigen Nebenverhältnisse, durch deren Kenntnis der Erscheinung Konstanz gegeben werden könnte, noch nicht zu beherrschen sind. Als solche Nebenverhältnisse kommen die vorhergehenden Kulturbedingungen besonders in Betracht. Offenbar können verschiedene Nährstoffe im Bak-

[1]) Laboratoriumskulturen vor 2 Jahren isoliert, sind noch ebenso brauchbar wie ganz frische.

[2]) »Tonotaxis« — Empfindlichkeit für osmotische Verschiedenheiten

terienkörper aufgespeichert werden (eben wie der Sauerstoff) und Unempfindlichkeit für bestimmte Stoffgruppen bedingen sowohl in osmotischer wie in chemotaktischer Hinsicht. Nur dann, wenn die Flüssigkeit eine lokale Herabsetzung der Konzentration erfährt, entsteht ein sehr konstanter tonotaktischer Effekt. Konzentrationserhöhungen geben in vielen Fällen jedoch entweder nur zu Strömungserscheinungen allein Veranlassung, oder, wenn sich dazu Tono- oder Chemotaxis gesellen, sind diese, so weit meine Versuche bis heute lehren, nur selten deutlich[1]).

Die Strömungserscheinungen entstehen, wenn man irgend ein Krystall eines nicht giftigen Körpers[2]) oder einen Tropfen einer Lösung davon in die dünne Schicht der Bakterienkulturen bringt (*b* und *d* Fig. 1 und 2 Taf. I, *b* im Holzschnitt). Ein Kochsalz-, ein Zuckerkrystall darin zu Boden liegend, löst sich unter Erzeugung eines kleinen schweren Flüssigkeitsberges höherer Konzentration wie die Umgebung, und der infolge seines Gewichtes seitlich abgleitet; dieser Gleitbewegung wird durch die Diffusion geholfen. In der Nähe muß demzufolge eine Rotation in der Flüssigkeit stattfinden derweise, daß im Centrum ein absteigender, an dem Rande ein aufsteigender Strom sich bewegt. Diese Rotation stört die Emulsionsfigur auf eine höchst eigentümliche und sehr zierliche Weise, welche hauptsächlich in einer radialen Anordnung der Emulsionsplatten resultiert, während die Seitenverbindungen und die tangential gestellten Platten so weit gedreht werden, daß sie ebenfalls radial zu stehen kommen. Ferner führt der Rotationsstrom fortwährend Bakterien aus der Peripherie nach dem Centrum, wodurch eine centrale Bakterienanhäufung entsteht.

Der Effekt bleibt Stunden, ja ein paar Tage lang sichtbar, wodurch minimale Spuren hineingebrachter löslicher Körper angezeigt werden. Die Erscheinung ist empfindlich genug, um zu einer annähernden Bestimmung des relativen spezifischen Gewichtes der verwendeten Flüssigkeit Veranlassung zu geben. Sehr viele Körper verhalten sich in Bezug auf die Emulsionsfiguren wie Kochsalz, d. h. sie erzeugen darin nur Strömungserscheinungen, welche kaum, und nur in sehr aktiven Kulturen, mit tonotaktischen Wirkungen gepaart sind.

4. Durch Verdünnung bedingte Veränderungen.

Bringt man einen Wassertropfen auf eine Emulsionsfigur (*c* im Holzschn., *a* in Fig. 1 u. 2 Taf. I), so kommt sehr bald darin eine tiefgreifende Veränderung: die Emulsionsfigur geht ganz verloren und anstatt derselben entsteht eine homogene Trübung. Unter Umständen, jedoch nicht immer, läßt sich dabei eine sehr deutliche Anhäufung der Bakterien in der Peripherie, Verminderung derselben im Centrum des Feldes konstatieren. Wie gesagt, kann diese Anhäufung jedoch ausbleiben, wodurch dann ein vollkommen homogenes Bakterienfeld anstatt der Emulsionsfigur resultiert (*c* im Holzschnitt). Auch diese Erscheinung beruht wohl zum Teil auf Strömungen, welche durch das geringere spezifische Gewicht des hinaufgelegten Tropfens

[1]) Wie man sieht, liegt hier eine Frage vor, womit sich vielleicht weitere Studien mit Frucht werden beschäftigen können. Wichtig bei allen hier in Betracht kommenden Verhältnissen ist der eben bei der Methode der Emulsionsfiguren erreichte gleichmäßige Sauerstoffzutritt, welcher bei Bewegungsversuchen unter Deckglas oder in Kapillären so schwierig zu beherrschen ist.

[2]) Gifte vernichten die Figuren sogleich und vollständig.

verursacht werden und welche eine Rotation hervorrufen müssen, derweise, daß an der Oberfläche ein auswärts, in der Tiefe ein einwärts gekehrter Strom stattfindet. Eine genaue Beobachtung der Erscheinung lehrt jedoch, daß diese Strömungen allein nicht imstande sind, dieselbe gänzlich zu erklären, sondern daß dabei osmotische Verhältnisse wirksam sind, welche den kleinen durch Diffusion bedingte Konzentrationsänderungen entsprechen. Daß dieses so sein muß, läßt sich schon aus der überraschenden Ausdehnung, welche die »Verdünnungsfelder« erreichen, ableiten, und mehr noch aus ihrer Stabilität, welche noch lange fortdauern kann, nachdem sie sich seitlich auszudehnen aufgehört haben und überzeugend beweist, daß ihre Fortexistenz bedingt wird durch das noch nicht eingetretene osmotische Gleichgewicht. Die Herstellung dieses Gleichgewichtes wird in solchen komplizierten Lösungen, wie verflüssigte Nährgelatine, wegen des colloidalen Zustandes eines Teiles der gelösten Substanzen selbst in den dünnen Schichten, welche hier in Betracht kommen, sehr lange auf sich warten lasen.

Schließlich verschwinden die Verdünnungsfelder, indem die aufgeschwemmten Bakterien sich wieder zu einer Emulsionsfigur anordnen. Da diese Anordnung jedoch nicht identisch ist mit der ursprünglichen, bleibt eine sehr charakteristische, oft zierliche Spur des einstigen Daseins der Felder zurück.

5. Durch Chemotaxis bedingte Veränderungen.

Auch in diesem Falle ist das sichtbare Kriterium zunächst das Verschwinden der Emulsionsfigur (*a* u. *c* in den Figuren). Dazu gesellt sich jedoch noch eine andere Wirkung, nämlich die lokale, zeitlich vorgreifende Erzeugung der Emulsionsfiguren durch chemotaktisch wirksame Körper in Flüssigkeitsplatten, wo ohne deren Gegenwart die Emulsionsfigur erst später entstehen sollte. Endlich ist in empfindlichen Kulturen eine centrale Anhäufung der Bakterien in der Mitte der Diffusionsfelder assimilierbarer Körper, offenbar, außer durch Strömung, auch durch positive Chemotaxis bedingt, bemerkbar.

Läßt man auf einer Schicht, wo die Figur noch nicht entstanden ist, eine Baumwollenzelle, ein Härchen etc., treiben, so bildet sich darum momentan eine mit unbewaffnetem Auge sichtbare Anhäufung, welche später zu einer Leiste oder einer Säulchenreihe in der ausgebildeten Figur wird. Wiederholt man den Versuch mit dem nämlichen Baumwollenfaden, so ergiebt sich, daß derselbe bald unwirksam wird, indem daraus die chemotaktisch wirksamen Körper verschwinden. Durch vorhergehende Extraktion kann man die Fäden sofort inaktiv machen.

Unter den gewöhnlichen Versuchsbedingungen — und diese Sache muß ganz besonders betont werden— ist die charakteristische Reaktionsfähigkeit nur dann kräftig ausgebildet oder auch nur dann überhaupt gegenwärtig, wenn die Bakterien nicht Zeit gehabt haben, vorher einen Reservevorrat des in Untersuchung genommenen Körpers (vielleicht auch anderer chemisch verwandter Stoffe) anzuhäufen. Wenn man z B. mit Glukose experimentiert, so bemerkt man gewöhnlich, daß nur das ganz frische Bakterienmaterial, welches von nicht allzu jungen [1]) Kulturen auf Fleisch-

[1]) Fleischgelatine und besonders Fleischagar enthalten eine nicht unbeträchtliche Zuckermenge, welche durch die Kulturen verbraucht sein muß, ehe die charakteristische Empfindlichkeit für Zucker erreicht wird (vergl. Note 1 p. 248).

gelatine oder Fleischagar herstammt, genügend reaktionsfähig ist, und daß beim wiederholten Durchschütteln der Masse zur Erzeugung neuer Felder sehr bald Unempfindlichkeit für Glukose eintritt, obschon die Emulsionsfigur im ganzen sich doch mit besonderer Prägnanz ausbildet, da eben der sich in den Bakterienleibern anhäufende minimale Zuckervorrat ihre Beweglichkeit zu erhöhen scheint.

Auf die Wirkung von Glukose näher eingehend (*a* im Holzschn., *c* Taf. I. Fig. 1 u. 2), bemerke ich, daß dadurch gewöhnlich sehr große Störungen in den Emulsionsfiguren hervorgerufen werden, besonders wenn die Aktivität der Bakterien so groß ist, daß sie auch auf die osmotische Veränderung, welche die sich ausbreitende Glukose hervorruft, reagieren dürften. Ich war nicht immer imstande, die Differenz zwischen diesen beiden Agentien, d. h. zwischen osmotischer und chemotaktischer Wirkung zu unterscheiden, da bei beiden das Verschwinden der Emulsoinsfigur der zunächst sichtbare Erfolg ist.

Doch ist jedenfalls der tonotaktische Effekt sehr gering, verglichen mit dem chemotaktischen, vielleicht gar nicht realisiert.

Ferner ist die Gestalt der Emulsionsfigur, welche sich schließlich in dem Glukosefeld wieder ausbildet, charakteristisch und nicht nur sehr verschieden von der Umgebung, sondern auch in spezifischer Weise verschieden von einer reinen Strömungsfigur, wie sie Kochsalz z. B. erzeugen würde. In der letzteren sind die schön radial angeordneten Bakterienplatten viel länger wie die mehr punktförmigen Anordnungen in den Zuckerfeldern, welche den so zarten Diffusionsströmungen entsprechen, die bei der spezifisch leichten Glukose so gut wie allein eine Rolle spielen.

Daß die Glukose wirklich eine kräftige chemotaktische Wirkung ausübt, das ergiebt sich auch noch sehr überzeugend aus dem Vergleiche mit Rohrzucker (*d* Taf. I. Fig. 1) und weniger gut aus dem Vergleiche mit Glycerin. Diese beiden Körper sind gänzlich unwirksam oder nur durch Konzentrationsänderung schwach wirksam und erzeugen deshalb, selbst in reinem Zustande hineingebracht, entweder kaum irgend eine Zerstörung der Emulsionsfigur oder nur einen Strömungseffekt (abhängig vom spezifischem Gewichte der verwendeten Kulturflüssigkeit), so daß deren große Verschiedenheit von Glukose weder von ihrer Diffusionsgeschiwndigkeit noch von ihrem eigenen spezifischen Gewichte, welches von demjenigen der Glukose nur wenig verschieden ist, herrühren kann.

Besonders die Randerscheinung an den Glukosefeldern ist eine charakteristische, welche auf zunächst negative mit beinahe sofort darauf folgender positiver Chemotaxis hindeutet. Die Bakterien der Emulsionsplatten und Stäbe werden nämlich, sobald die verdünnte Glukoselösung sie durch Diffusion erreicht, etwas nach außen getrieben, um bald nachher in umgekehrte Bewegung zu geraten und sich in die Glukose hineinzustürzen, wodurch ein eigentümlicher Bakterienring entsteht (vergl. *a* im Holzschnitt), auf dessen Außenseite bisweilen (in der Figur nicht angegeben) ein bakterienarmer Raum sichtbar wird.

Die Erscheinung ist bei genügend aktiven Bakterien ungemein merkwürdig; und wenn bei erster Versuchsanstellung nicht sofort ein befriedigendes Resultat erhalten werden sollte, so muß man dabei eingedenk sein, daß vorher in den Bakterien angehäuftes Reservematerial die Richtung ihrer Empfindlichkeit bedingt, und daß es unter solchen Umständen am besten ist, den Platten etwas neue Nahrung von bekannter chemischer Natur, wie Peptonlösung oder Fleischbouillon darzureichen, wo-

durch innerhalb weniger Stunden in den dünnen, stark aërierten Schichten neues Wachstum eingeleitet wird und eine Bereicherung an Bakterienindividuen entsteht, welche ihre früheren Reservestoffe verbraucht haben.

6. Einfluß eines Oeltropfens.

Bringt man mit der Spitze eines Platinfadens ein kaum sichtbares Oeltröpfchen auf die Oberfläche einer Emulsionsfigur, welche sich in fettfreier Flüssigkeit ausgebildet hat, so erblickt man eine plötzliche Veränderung über die ganze Strecke, worüber das Oel sich verbreitet und welche zunächst darin besteht, daß die Emulsionsfigur erschüttert wird und für das Auge, jedoch nicht in Wirklichkeit, verschwindet. Kurz nachher kehrt sie wieder zurück, und zwar unter einer charakteristischen und sehr zierlichen Formveränderung. Diese erinnert an den Einfluß, welcher die Strömung in einem Felde höherer Konzentration hervorruft, und besteht hauptsächlich in einer vollkommen genau radialen Anordnung der Hauptlinien der Figur, mit dem Punkte, wo das Oeltröpfchen aufgelegt wurde, als Mittelpunkt; nur da und dort werden ziemlich genau tangential verlaufende Verbindungen zwischen den Hauptlinien sichtbar. War das Oeltröpfchen in eine runde Glasdose excentrisch auf die Flüssigkeit gelegt, so sieht man zwischen dem Oelcentrum und dem benachbarten Teile der Glaswand eine Krümmung in den Radien, die seitliche Ausbreitung des Oels andeutend, welche sozusagen durch dei Glaswand reflektiert wurde. Kurz man erblickt, sozusagen in einem fixierten Bilde, alle diejenigen Strömungserscheinungen, welche nach unserer Vernunft bis auf eine gewisse Tiefe in einer Flüssigkeit stattfinden müssen, deren Oberflächenspannung plötzlich eine große Veränderung erfährt.

Wenn ich im Vorhergehenden hauptsächlich Bacterium Termo ins Auge gefaßt habe, so wünsche ich noch einmal ausdrücklich hervorzuheben, daß mir auch mit mehreren anderen Arten Erfahrungen vorliegen, welche ebenso prägnant sind und zu weiteren Versuchen auffordern. Die Subtilität der Erscheinung macht es erwünscht, daß auch andere Forscher sich darüber aussprechen.

13. Dezember 1896.

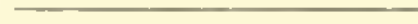
Bemerkung zu Tafel I und II.

Die Photographie konnte der Zartheit der Details durchaus nicht gerecht werden, so daß die Figuren nur annähernd der Natur entsprechen, doch geben sie, mit der Lupe betrachtet, eine ziemlich richtige Vorstellung wenigstens der Emulsionsfiguren im Allgemeinen. Weil der Boden der Glasschale nicht eben war, sind die Felder nicht rund.

Fig. 1. Emulsionsfigur von Bacterium Termo, mit Wasserfeld *a*, Kochsalzfeld *b*, Glukosefeld *c* (sehr verdünnt), Rohrzuckerfeld *d* (sehr konzentriert, eben entstehend).

Fig 2. Emulsionsfigur von Bacterium Termo, mit Wasserfeld *a*, Kochsalzfeld *b*, Glukosefeld *c*.

Fig. 3. Genaue Zeichnung eines Lanternbildes einer Photographie (1 ½ mal vergrößert). *a* Chemotaktisches Feld durch Glukose mit in der Mitte angehäuften Bakterien, welche eine sekundäre Emulsionsfigur erzeugt haben; *b* Strömungsfeld durch Kochsalz; *c* Verdünnungsfeld mit gleichmäßig verteilten Bakterien durch Wassertropfen.



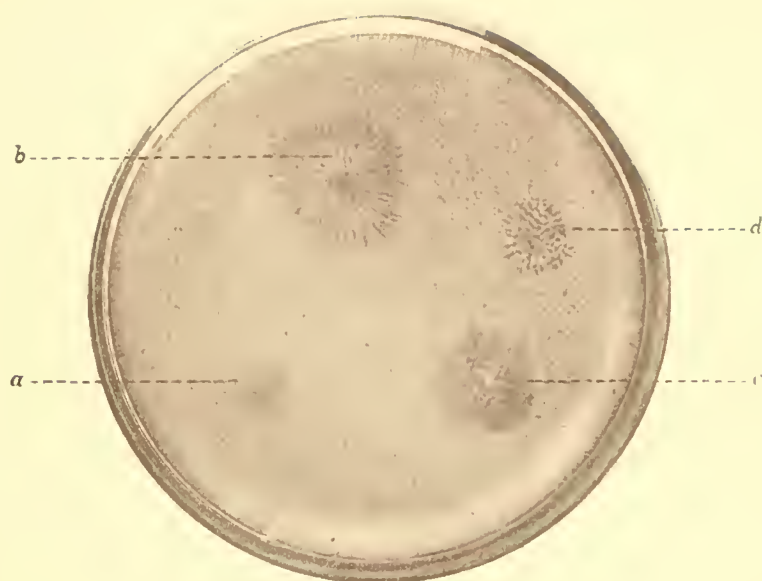


Fig. 1.



Fig. 2.

Emulsionsfiguren von *Bacterium termo*.

a Wasser-, *b* Kochsalz-, *c* Glukose-, *d* Rohrzuckerfeld.

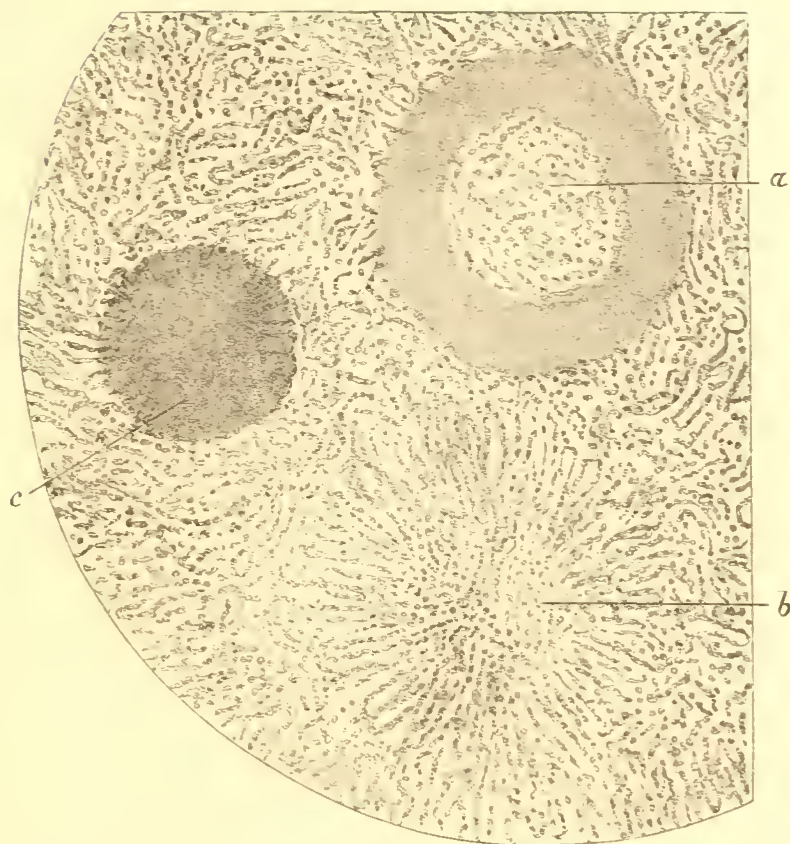


Fig. 3.

Amöbenkultur auf festen Substraten.

Antwort an Herrn Celli.

Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde, Jena, I. Abteilung, XXI. Band, 1897, S. 101—102.

Kurz nachdem ich in diesem Blatte einen Aufsatz über Amöbenkultur auf festem Substrat veröffentlicht hatte[1]), erhielt ich von Herrn Celli eine sehr interessante Abhandlung über denselben Gegenstand[2]), worüber der Autor übrigens auch in diesem Blatte, als Antwort auf meinen Aufsatz, berichtet hat[3]).

Dass ich noch einmal die Feder aufnehme, um darüber zu sprechen, geschieht nur, um einen Unterschied zu betonen, welcher zwischen unseren Kulturresultaten besteht, namentlich zwischen meinen Kulturen von Amoeba zymophila und denjenigen von Herrn Celli, wobei ich jedoch sofort bemerken will, dass meine A. nitrophila auf gleicher Linie mit Herrn Celli's Kulturen steht.

Dieser Unterschied besteht darin, dass meine A. zymophila eine wirkliche Reinkultur ist, und wie ich damals deutlich beschrieben, willkürlich auf jeglichen Nährboden übergebracht, und mit bestimmten, ebenfalls willkürlich zu wählenden Mikrobenarten ernährt werden kann, wobei ich als solche Ernährer Essigbakterien, Apiculatushefe und Coli commune verzeichnet habe.

Bei Herrn Celli's Versuchen (sowie bei den meinigen mit A. nitrophila) ist von einer wirklichen Reinkultur nicht die Rede[4]), die Ueberbringung auf ein willkürliches Nährsubstrat, z. B. auf Fleisch- oder Malzgelatine ist nicht möglich, wegen der Bakterienüberwucherung, wodurch bald die Amöben verschwinden würden. Auch ist es fraglich, ob Herrn Celli's Amöben sowie meine A. nitrophila überhaupt auf solchen extraktreichen Nährböden gedeihen können, selbst wenn es möglich wäre, die Bakterien etc. fernzuhalten, oder, richtiger, nach dem Bedürfnisse der Amöben zu wählen.

Alles dieses ist jedoch bei meiner Amoeba zymophila erreicht, und zwar so gut erreicht, dass ich meine Kulturen nun seit mehr als einem Jahre auf dieselbe Weise fortführe, als ob es sich um einen gewöhnlichen saprophytischen Mikroorganismus handelte.

---

[1]) Centralbl. f. Bakteriologie. I. Abt. Bd. XIX. 1896. p. 267.

[2]) A. Celli e R. Fiocca, Intorno alla Biologia delle Amebe. (Estr. d. Annali d'Igiene sperimentale. Vol. V. 1895. Fasc. 2. p. 177.)

[3]) Centralbl. f. Bakteriologie. I. Abt. Bd. XIX. 1896. p. 536.

[4]) Wie aus Herrn Celli's eigenen Worten (dieses Blatt l. c. p. 537) hervorgeht.

In meinen Kulturen von A. zymophila liegt also einerseits ein Beispiel vor von einer Amöbe, welche an saure und konzentrierte Nährmaterialien adaptiert ist, und andererseits das erste Beispiel einer Amöbenreinkultur im wissenschaftlichen Sinne, welche beide Umstände in Herrn Celli's Kulturen nicht realisiert sind.

Uebrigens ist mein Verfahren zur Kultur der Erdamöben auf ausgewachsenen Agarplatten ebenso einfach wie Herrn Celli's Methode auf Chondrus crispus, und nicht, wie Herr Celli sagt, viel komplizierter.

Dass ich nicht früher diese Antwort eingesandt habe, geschah deshalb, weil ich zunächst sicherstellen wollte, ob meine A. zymophila eine wirkliche Errungenschaft für das Laboratorium ist. Da ich glaube, dieses nun praktisch erwiesen zu haben, kann es nur angezeigt sein, die Sache noch einmal aus dem Schlafe der Zeiten zu erwecken.

Delft, 6. Januar 1897.

Weitere Beobachtungen über die Octosporus-hefe.

Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde, Jena, II. Abteilung. III. Band, 1897, S. 449—455, 518—525.

Die Gattung Schizosaccharomyces umfaßt gegenwärtig drei verschiedene Arten, nämlich S. octosporus, S. pombe[1]) und S. asporus (Arrakhefe). Als ich im Jahre 1894 die Entdeckung der ersteren publizierte, kannte ich S. pombe noch nicht durch Autopsie, und glaubte auf Grund der vorliegenden Beschreibungen, daß S. pombe und S. asporus identisch sein könnten. Inzwischen hatten gewisse Beobachtungen mich darüber in Zweifel gebracht und lernte ich durch die Freundlichkeit des Herrn Lindner die Pombehefe näher kennen. Ich fand sofort, daß Herrn Eykman's Arrakhefe davon sehr verschieden ist. So bringen viele Zellen von S. pombe konstant 4 Ascosporen hervor (welche sich mit Jod schwach blau färben), während S. asporus vollkommen asporogen ist. Dazu kommen viele andere Unterschiede.

Gewisse Fragen bezüglich der Variabilität wilder Organismen, welche in Kultur genommen werden, veranlaßten mich, meine frühere etwas fragmentarische Studie der Octosporushefe wieder aufzunehmen, weil darin ein außerordentlich geeignetes Material für Versuche bezüglich der Zellvariabilität vorzuliegen schien. Meine Erwartung ist dabei nicht getäuscht und die nun schon beobachteten Erscheinungen, besonders die Entstehung einer asporogenen Rasse, dürften zur Hypothese führen, daß sowohl Schizosaccharomyces pombe wie Sch. asporus daraus als tief veränderte Kulturformen entstanden sein können. Jedenfalls kann ich nachweisen, daß während der relativ kurzen Zeit, seitdem ich die Octosporushefe in Kultur habe, darin ohne Selektion tiefgreifende Rasseveränderungen bemerkbar geworden sind, welche soweit gehen, daß, wenn in der Natur aufgefunden, kein Systematiker zögern würde, darauf Artdifferenzen zu gründen. Um diesen Nachweis streng zu bringen, war es notwendig, den alten Stamm mit einem frisch isolierten zu vergleichen; ich mußte deshalb eine Methode aufsuchen zur wiederholten Reinkultur meiner Hefe aus den natürlichen Rohmaterialien. Nach vielen vergeblichen Versuchen habe ich eine solche gefunden, welche als «Trockenmethode» würde bezeichnet werden können, und die auf dem verschiedenen Verhalten von vegetativen Zellen und Ascosporen beim Eintrocknen bei erhöhter Temperatur beruht.

---

[1]) Hätte der unglückliche Name »pombe« nicht Prioritätsrechte, so wäre eine Ersetzung desselben durch »tetrasporus« sehr wünschenswert. Ein guter Name ist keine gleichgiltige Sache, besonders wenn es sich, wie hier, um Organismen von hoher wissenschaftlicher Bedeutung handelt.

Ueber die direkten bewirkenden Ursachen der Bildung der asporogenen Hefeart herrscht wie überall, wo es sich um Fragen der Variabilität handelt, noch Dunkelheit. Zwei Umstände, welche bei den Laboratoriumsversuchen anscheinend direkt bewirkend eingreifen, sind die einseitige Erschöpfung an gewissen Ernährungssubstanzen und der fortwährende Kontakt mit dem feuchten oder flüssigen Medium, d. h. das nicht regelmäßige Abwechseln zwischen Wachsen und Austrocknen. Ob eine Zerlegung dieser ziemlich komplizierten Verhältnisse in einfachere Faktoren möglich ist, müssen fernere Versuche lehren.

Eine Erscheinung, welche bei den Alkoholhefen allgemein verbreitet ist, besonders deutlich aber bei der Octosporushefe zu Tage tritt, ist die Proteolyse. Darüber liegen bisher nur die spärlichen Angaben vor, welche von Herrn H. Will zusammengestellt sind. Auch darauf wurde durch die so klaren Verhältnisse bei der Octosporushefe mehr Licht geworfen. Es ergab sich nämlich, daß die Absonderung des Enzyms mit dem langsamen Absterben des Zellinhaltes zusammenhängt, und daß das Enzym selbst zu den Trypsinen und nicht zu den Pepsinen gehört. Es ist angezeigt, dasselbe Hefetrypsin zu nennen, weil es nicht völlig identisch mit den Pankreastrypsin ist. Für andere untersuchte Alkoholhefen konnte das gleiche Ergebnis festgestellt werden.

1. Vorkommen in der Natur.

In meiner ersten Mitteilung über Schizosaccharomyces octosporus[1]) habe ich die Ansicht ausgesprochen, daß diese Hefe wohl ziemlich allgemein verbreitet sein muß[2]). Ich gründete diese Anschauung auf das mikroskopische Bild einiger mit Korinthen in Malzwürze erhaltenen Gärungen, worin, trotz einer Ueberwucherung durch andere Alkoholhefen, welche die Isolierung verhinderten, einzelne der so äußerst charakteristischen Zellpaare unserer Pflanze aufgefunden waren. Zu dem Zwecke einer erneuten Isolierung habe ich den genannten Gärungsversuch einige Male wiederholt, und zwar mit dem Erfolg, daß ich nun schon in einer Reihe von Fällen mit aller Sicherheit im mikroskopischen Präparate Schizosaccharomyceten auf Korinthen (von nicht genau bekannter Herkunft, jedoch sicher aus Griechenland, Kleinasien und der Türkei) gefunden habe. In solchen Gärungen finden sich nur vegetative Zellen und keine Ascen; die Isolierung derselben war wegen der massenhaften Ueberwucherung durch gewöhnliche Hefen unmöglich, so daß ich selbst nicht sicher sagen kann, ob die mit dem Mikroskope gesehenen Zellen alle wirklich völlig identisch mit meiner 1892 isolierten Hefe sind; nur soviel steht fest, daß die vegetativen Zustände sehr nahe übereinstimmen, und jedenfalls eine nächstverwandte Form vorliegen muß.

Bei diesen erneuten Versuchen hatte ich meine Beobachtungen auch auf andere Orientfrüchte ausgedehnt, welche trocken im Handel vorkommen. Dabei hat sich herausgestellt, daß unsere Hefe auch auf Feigen vorkommt, und zwar auf den besseren Qualitäten aus Smyrna. Dagegen haben Datteln und Rosinen

---

[1]) Centralbl. f. Bakt. etc., Bd. XVI, 1894, p. 49.

[2]) Gemäß meiner damals ausgesprochenen Erwartung wurde die Octosporushefe angeblich auch von anderer Seite beobachtet, so von den Herren Bouin in Nancy und Schiönning in Kopenhagen.

immer ein negatives Resultat gegeben, obschon ich besonders mit den letzteren viele Versuche angestellt habe. Auch aus den Feigengärungen ist die direkte Isolierung nicht gelungen, ebenfalls durch die Ueberwucherung anderer Hefearten. Ich mußte mich deshalb nach einer besseren Isolierungsmethode umsehen.

In den mit Früchten von mehr nördlichen Gegenden angestellten Gärversuchen fehlten die Schizosaccharomyceszellen immer vollständig; dieses hängt offenbar damit zusammen, daß diese Gattung erst merklich oberhalb 20^0 C wächst und unterhalb 15^0 C sich nicht vermehrt; es handelt sich also um Bewohner der wärmeren Klimate, weil die natürlichen Wärmequellen unserer Gegenden, wie Mist, wohl den Bedürfnissen vieler thermophiler Bakterien, jedoch nicht denjenigen der Alkoholhefen entsprechen.

Nach dem Vorhergehenden ist es kaum nötig, noch darauf hinzuweisen, daß auch im Schleimflusse der Bäume keine Schizosaccharomyceten vorkommen. Da ich jedoch seit dem Erscheinen meines genannten Aufsatzes imstande gewesen bin, Schleimflußfälle genau zu untersuchen, will ich darüber noch einige Worte sagen. Zunächst erhielt ich großartige Sendungen von Herrn Prof. Ludwig aus Greiz und später habe ich selber eine Eiche bei de Grebbe in Gelderland gefunden, welche die Erscheinung zwar nur an einer einzelnen Stelle zeigte, jedoch in typischer Ausbildung. In dem Materiale von Herrn Ludwig waren die eigentlich interessanten Arten abgestorben, dagegen gelang mir deren Isolierung leicht aus dem niederländischen Materiale. Als ich die schleimige Masse auffand, war dieselbe gänzlich überdeckt mit einer Schicht kleiner, brauner Fliegen und entwickelte einen ebenso herrlichen Geruch nach Estern, wie ich niemals anders beobachtet habe. Natürlich richtete ich meine Aufmerksamkeit zunächst auf die Schleimbakterien, welche offenbar die eigentliche Ursache der Erscheinung sind, und allen anderen Bewohnern Platz bereiten. Die Isolierung war eine schwierige, und es hat sich herausgestellt, daß die aktive Bakterie, welche von Herrn Ludwig Leuconostoc Lagerheimii genannt wird, eine stark schleimerregende Essigbakterie ist. Die übrigen bisher aus dem Schleimflusse beschriebenen Arten ließen sich viel leichter isolieren wie der Urheber, und bis heute kultiviere ich die interessanteren darunter immerfort. Meine frühere Erwartung, daß sich im Schleimflusse Maltosehefen vorfinden könnten, ist jedoch durchaus nicht verwirklicht, alle darin vorkommenden Gärungserreger vergären nur Saccharose und Glukose, wie denn auch überhaupt in der Eiche keine Maltose vorkommen dürfte [1]). Von Schizosaccharomyces nicht die geringste Spur.

[1]) Die kräftigen Gärungserscheinungen, welche Glukosehefen, wie S. apiculatus, Saccharosehefen, wie S. Ludwigii etc., in Malzwürze hervorrufen, dauern nur so lange, als die entsprechenden Zuckerarten vorkommen; die Maltose bleibt bei der Gärung unberührt und kann gänzlich unverändert bleiben, oder vielleicht nachträglich für Wachstum in Betracht kommen, so lange bestimmte Stickstoffquellen nicht fehlen.

Bei dieser Gelegenheit wünsche ich noch zu bemerken, daß Endomyces Magnusii bei mir niemals Sporen erzeugt, und daß ich Brefeld's darauf bezügliche Figuren nicht für völlig beweisend halte, weil die Auskeimung nicht gesehen ist. Niemand hat hier die Gegenwart von Ascosporen überzeugend erwiesen, und nach meiner Ansicht handelt es sich dabei jedenfalls um eine besondere Art der Gattung Oidium. Die Gärung, welche dadurch in glukosehaltigen Lösungen hervorgerufen wird, steht nicht damit im Widerspruche, denn ich erhielt von Herrn Ludwig eine ganz andere,

Leider war das aufgefundene Material so wenig voluminös, daß erfolgversprechende Infektionsversuche damit nicht gemacht werden konnten. Zwar habe ich solche im großen Maßstabe ausgeführt mit Prof. Ludwig's Sendungen, jedoch mit negativem Erfolge, was aber kaum anders erwartet wurde, weil ich daraus die schleimerregende Essigbakterie auch nicht mehr isolieren konnte. Vielleicht werden mit den in Reinkultur gebrachten Essigbakterien Infektionsversuche gelingen, was noch nicht versucht wurde. Bei dem von mir aufgefundenen Falle war es nicht möglich, die Gegenwart von Cossus ligniperda zu konstatieren. Dennoch meinte ich, daß die schleimende Stelle einer Verwundung entsprach, vielleicht durch das Abreißen eines Astes entstanden.

2. Methode zur Isolierung: Trennung der Ascosporen von den vegetativen Hefezellen.

Als ich durch die bei vielen Gärungen gemachten Erfahrungen die Ueberzeugung gewonnen hatte, daß die Octosporushefe eine allgemein vorkommende Art ist, habe ich mich bemüht, dieselbe in den Waschwässern der früher genannten Orientfrüchte nachzuweisen. Ich vermutete, daß darin die achtsporigen Ascen vorkommen müßten, welche so charakteristisch sind, daß deren Gegenwart wohl nicht durch Erde und Schmutz würde verdeckt werden können. Auch dieser Nachweis ist mir in den Waschwässern gewisser Muster von Korinthen mehrfach gelungen. Als ich dadurch die weitere Ueberzeugung gewonnen hatte, daß die Octosporushefe jedenfalls im Ascosporenzustande in dem Rohmateriale vorkommt, konnte an die Trennung dieser Ascosporen von den anderen Hefen, welche wenigstens meistenteils nur als vegetative Zellen angetroffen werden, gedacht werden.

Ich legte mir nun die Frage vor: Ist es möglich, bei den Hefen die vegetativen Zellen zu töten, ohne dabei die Ascosporen zu schädigen? Als Versuchsmaterial erschien die Octosporushefe selbst besonders geeignet, weil sie eine asporogene Rasse erzeugt hat, und anderseits massenhaft Sporenmaterial darbietet. Ich will hier nicht die verschiedenen Versuche schildern, welche kein Resultat gegeben haben, sondern sofort den mit Erfolg gekrönten Weg bezeichnen: Die Ascoporen können im trockenen Zustande bis auf 105°, 110°, ja bis auf 115° C (und vielleicht bei absoluter Wasserentziehung noch höher) erhitzt werden, ohne abzusterben. Die vegetativen Zellen sterben dagegen auch im trockenen Zustande schon bei viel niedrigeren Temperaturen, nämlich bei ca. 80° C vollständig ab, während schon bei 56° C ein massenhaftes Absterben derselben beginnt [1]).

Wie ich erwartet hatte, und das ist eben das Prinzip der Trennungsmethode geworden, sterben auch die vegetativen Zellen der fremden Hefen beim Erhitzen

---

ziemlich nahe mit Oidium lactis verwandte Oidiumart, welche ebenfalls Glukose alkoholisch vergärt. Diese Form wurde von Herrn Ludwig in dem Schleimflusse (wie ich meine) einer wilden Kastanie gefunden.

[1]) Wie sich andere Alkoholhefen in dieser Beziehung verhalten, werde ich später mitteilen.

im trockenen Zustand schon massenhaft bei ca. 56° C, wodurch sich bequem eine relative Anreicherung der Ascosporen in Bezug auf die vegetativen Zellen anderer Hefen in irgend einem Materiale erreichen läßt, das einzige, was für erfolgreiche Isolierung notwendig ist.

Diese Erfahrung wurde nun die Basis für folgendes Trennungsverfahren:

Mit viel anhängender Erde verunreinigte Korinthen[1]) sowie Feigen wurden mit wenig Wasser abgewaschen und dieses nach kurzer Zeit (um nicht zu viel Zucker zu extrahieren) abgelassen, auf eine Glasplatte ausgegossen und dann langsam im Thermostaten bei 30° C getrocknet. Die trockenen Platten wurden dann in eine Trockenstube gebracht und sehr langsam bis auf 56° C erhitzt. Bei dieser Temperatur wurde mit einem Messer etwas Material abgekratzt oder es wurde aufgeweicht, und das Material einerseits zur Aussaat auf Malzwürzegelatine verwendet (wobei jedoch nur in sehr vereinzelten Fällen Octosporuskolonieen erhalten wurden), andererseits wurden damit Gärungsversuche ausgeführt, indem es in flüssige Würze von 10 Saccharometergraden gebracht wurde, welche mit Milchsäure auf den Säuretiter 6—9 Proz. Normalsäure gebracht war. Besonders die letztere Versuchanstellung gab ein interessantes und beinahe konstantes Resultat. Bei 30° C aufgestellt, blieben die meisten Kölbchen während 3 Tagen unverändert. Dann bildete sich darin (neben Mycel von Aspergillus niger, welches leicht mit dem Platinfaden zu entfernen ist) ein weißes Präcipitat von Tetraden und Octaden der Octosporushefe augenscheinlich in Reinkultur; als diese sich stark vermehrte, kam jedoch auch ein gewöhnlicher Saccharomyces zur Entwicklung, welcher am 6. Tage sozusagen Alleinherrschaft erlangte und die Octosporushefe zurückdrängte. Natürlich hatte ich am 4. Tage, als die fremde Hefe noch kaum sichtbar war, eine Würzegelatinplatte angelegt, welche bei der von mir stets geübten »Oberflächenaussaat« ein wunderschönes Kolonieengemisch von schneeweißen, mehr trockenen, etwas rauh punktierten Octosporuskolonieen und wenigstens drei mehr gelblich gefärbten gewöhnlichen Hefearten hervorbrachte. Diese drei letzteren waren deshalb durch Eintrocknen bei 56° C so lethargisch geworden, daß sie mehrere Tage zum Auskeimen erforderten, während Octosporus offenbar sofort ausgekeimt war. In dem für diesen Versuch verwendeten Präparate fehlte Weinhefe. Wäre diese gegenwärtig gewesen, so würde ich höher erhitzt haben, weil die letale Temperatur dafür höher liegt.

Die von Smyrnafeigen isolierte Octosporushefe kann ich nicht von den unter sich ebenfalls identisch erscheinenden Korinthenisolierungen unterscheiden.

Da mein zunächst beabsichtigter Zweck erreicht war, ist es nicht notwendig, auf die Folgen der weiter fortgesetzten Erhitzung des eingetrockneten Hefematerials hier näher einzugehen.

In Bezug auf die Versuchsanstellung wünsche ich noch zu bemerken, daß die Gärungserscheinungen einen schnelleren Verlauf haben können, wenn die Würze nicht auf 6—9 Proz. Normalsäure angesäuert wird, sondern niedriger; da die Octosporushefe aber Säure gut verträgt, fand ich es den zahlreichen mit

---

[1]) Besonders türkische Korinthen sind stark verunreinigt und tragen viel Octosporushefe.

hineingebrachten Bakteriensporen gegenüber ratsam, den Säuretiter hoch zu nehmen. Allerlei andere Betrachtungen, wozu mein Versuch Veranlassung giebt, müssen hier übergangen werden [1]).

3. Bildung einer asporogenen Rasse bei der Octosporushefe.

Es ist von verschiedenen Seiten darauf hingewiesen, daß die Ascosporenbildung bei den Saccharomyceten trotz ihrer hohen Bedeutung für die Diagnose der wilden Arten eine höchst veränderliche Erscheinung ist, welche in unseren Laboratoriumskulturen durchaus keine Konstanz besitzt und für die Charakteristik der Varietäten jedenfalls bei unseren gegenwärtigen Kenntnissen nicht zu verwenden ist. Meine Erwartung, daß auch bei der Octosporushefe Verschiedenheiten zwischen den verschiedenen Zellen in Bezug auf die Leichtigkeit der Ascosporenbildung bemerkbar sein würden, hat sich in ganz eklatanter Weise bestätigt. Es hat sich nämlich herausgestellt, daß schon sofort bei der Kultur und deshalb auch wohl im Naturzustande eine Spaltung unserer Hefe in zwei Rassen stattfindet, welche als »vegetative und generative« oder besser, vielleicht, als »asporogene« und »sporogene Rasse« benannt werden können, und welche, wie mit einem Blicke aus meinen Photogrammen zu sehen ist, so außerordentlich verschieden sind, daß man eigentlich mehr geneigt ist, hier von verschiedenen Arten wie von Rassen zu sprechen. Ferner ergab sich, daß die Manipulationen der Reinkultur die fortwährende Anhäufung der vegetativen Rasse begünstigen. Schon längst war mir aufgefallen, daß meine Kulturen eine außerordentliche Verschiedenheit in der Anzahl der Ascosporen bei übrigens gleichen Kulturbedingungen aufweisen. Eine genauere Verfolgung zeigte, daß es sich um eine Erscheinung handelt, welche nicht nur in der genannten Beziehung, sondern auch in anderen Hinsichten den in Betracht kommenden Zellen ein besonderes Verhalten aufprägt, welches zwar nur bei sehr bestimmten Kulturbedingungen leicht zur makroskopisch sichtbaren Beobachtung kommt, aber einmal aufgefunden, sich unter den verschiedenartigsten Verhältnissen als konstante Erscheinung ausweist. Zunächst sei bemerkt, daß ich hier unter »bestimmten Kulturbedingungen« das Anlegen von Kolonieenkulturen auf dicken Würzeagarplatten verstehe. Dieses ist durchaus notwendig, um bei der Selektion ein sicheres Kennzeichen zu haben; auf Würzegelatine ist der Unterschied zwischen den beiden Formen nicht makroskopisch zu beobachten. Es stellt sich dagegen heraus, daß die Kolonieenkulturen, welche auf Würze-

[1]) Nur eines will ich noch bemerken. Zur Begründung seiner Ansicht, daß die Alkoholgärung nicht notwendig die Gegenwart lebenden Protoplasmas erfordert, führt Herr E. Buchner an (Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch., Bd. XXX, 1897, p. 1110; vergl. auch H. Will, Zeitschr. f. Brauwesen, Jahrg. XX, 1897, p. 362), daß bei 100° C getrocknete Hefe (unter Umständen) noch imstande ist, Rohrzucker zu vergären. Wie man aus meinem Versuche sieht, kann ich darin keinen Beweis sehen, denn auch das für die Ascosporen in Anwendung kommende Protoplasma der Hefezelle kann auf 100° C erhitzt werden, ohne zu sterben. Aber selbst aus der Tatsache, daß eine Hefezelle nicht mehr zum Wachstum zu bringen ist, darf nicht ohne weiteres geschlossen werden, daß alle Konstituenten darin tot sind. Ich würde dafür allerlei Analogieen aus dem Pflanzen- und Tierreich anführen können, welche zeigen, daß bestimmte Teile nicht wachstumsfähiger Zellen dennoch lebendig sein konnen.

agarplatten oder in Reagenzröhren auf Würzeagar angelegt werden, bei vollständiger Reife, d. h. nach der Erschöpfung des Nährbodens, von dreierlei Natur sind: Erstens weiße, welche nur aus Ascen und Ascosporen bestehen; zweitens hellbräunliche, welche nur vegetative Zellen und ascenartige, jedoch ascosporenfreie Zellen enthalten; drittens sehr leicht braune, »gemischte« mit allen drei Elementen. Eben diese an und für sich geringe Farbenverschiedenheiten haben mich zur Entdeckung der Rassenbildung geführt.

Die hellbräunlichen Kolonieen ergeben sich bei der Aussaat als konstant und erblich asporogen.

Bei der Aussaat der »weißen« Kolonieen entstehen neben vielen weißen wieder einige »braune«, woraus sich, wie zuvor, die asporogene Form als konstante Rasse ableiten läßt, sowie zahlreiche »Mischkolonieen«.

Werden von den sehr leicht braunen »Mischkolonieen« neue Kolonieenaussaaten angelegt, und zwar ebenfalls auf Würzeagar, so ergiebt sich, daß sie ebenfalls in »weiße« und »braune« zerfallen, nur in anderem Verhältnisse wie bei der Aussaat der weißen, wovon sie offenbar nur graduell verschieden sind.

Sät man nämlich den Mischkolonieen entlehntes Material auf Würzeagar, so entstehen daraus die braunen, vollständig asporogenen Kolonieen vielleicht zu 1 Proz. in Bezug auf die weißen, ascenführenden. Werden dagegen die weißen Kolonieen auf gleiche Weise untersucht, so mag die Zahl der sich daraus bei direkter Aussaat bildenden braunen, gänzlich asporogenen Kolonieen eins gegen Zweitausend sein. Daß bei einem so ungünstigen Verhältnisse die vegetativen Zellen dennoch im Laufe der Zeit so stark in den gewöhnlichen Reinkulturüberimpfungen vorherrschen, hängt mit deren stärkerem Vermehrungsvermögen unter ungünstigen Bedingungen (z. B. Erschöpfung des Nährbodens, Luftmangel, zu hohe Temperatur) zusammen.

Da ich die Zahl der »braunen«, asporogenen Kolonieen bei erster Isolierung aus den Rohmaterialien ungefähr beurteilen kann, glaube ich, daß, wenn dazu irgend eine Veranlassung vorlag, es leicht sein würde, aus dem Verhältnisse zwischen Ascen und vegetativen Zellen in den älteren Reinkulturen zur Zeit, wenn wegen Erschöpfung des Nährbodens kein Wachstum mehr stattfindet, auf jene erste Isolierungszeit derselben zu schließen. Doch halte ich die Sache im Augenblicke noch nicht für wichtig genug, um darauf Zeit zu verwenden, und nur eins wünsche ich, um den Gang dieser Verhältnisse anzuweisen, noch zu bemerken: Bei den frisch aus den Waschwässern der Orientfrüchte isolierten Kulturen erzeugen auf geeigneten Würzeagarplatten alle Zellen nach ganz wenigen Teilungen ohne Ausnahme Ascen unabhängig vom Nahrungsüberschuß. Dann keimen in den eigenen (nicht übergeimpften) Kulturen viele Ascosporen in den Kolonieen selbst sofort wieder aus und hierbei entstehen permanent asporogene Zellen und zahlreiche neue Ascen. Allmählich, und wie es scheint, nach einem bestimmten Gesetze, vermehrt sich unter dem Einflusse des Lebens im Laboratorium die Zahl der vegetativen Zellen, welche keine Ascen erzeugen, bei jeder neuen Ueberimpfung, soweit diese ohne Kolonieenselektion geschieht, ohne daß dabei zunächst äußerlich unterscheidbare Kolonieen sichtbar werden. Endlich wird das innere Gleichgewicht so sehr gestört, daß braune Flecke, welche gänzlich aus erblich asporogenen Zellen bestehen, da und dort auf dem Impftische zur deutlich makroskopisch sichtbaren Ausbildung gelangen.

Die asporogene Rasse hat folgende Eigenschaften: Die Mehrheit der Zellen ist beinahe ganz rund und nur kurz vor der Teilung etwas ellipsoidisch gestreckt (vergl. Taf. VIII, Fig. 3). Die Vermehrung findet in den Kolonieen auf Würzegelatine zunächst nach dem gewöhnlichen Schema unter »Jochbildung« statt (Taf. VII, Fig. 1), beim Aelterwerden der Kultur dagegen nur durch sehr regelmäßige Zweiteilung, wobei die Teilprodukte einander meistens sofort verlasen, ohne die eigentümlichen »Joche« zu erzeugen, welche für die ascenbildende Rasse (Taf. VII, Fig. 2) so charakteristisch sind. Untersucht man die auf Würzegelatine gealterten Kulturen der vegetativen Rasse zur Zeit, wenn durch Erschöpfung des Nährbodens das Wachstum still steht, so ist der Zustand folgender: Zahlreiche Zellen sind beträchtlich geschwollen, jedoch durchaus nicht so stark wie bei der Ascenbildung, und mit der Anschwellung ist bei anderen Zellen eine erneute Zellteilung einhergegangen, oft mit aufeinander senkrecht gerichteten Wänden, wodurch ein sarcineartiges Aussehen entsteht. Solche Zellgruppen sind jedoch meistens nur 4-, 5- oder 6-zellig. Die großen angeschwollenen Zellen zeigen mit außerordentlicher Klarheit einen großen abgeplattet-kugeligen, oft doppelten Zellkern im Protoplasma. In flüssiger Würze kultiviert, ist die Verschiedenheit zwischen den beiden Rassen viel geringer, da sowohl bei der sporenbildenden wie bei der asporogenen nicht nur zweizellige Joche vorkommen, sondern ebenfalls Zellfäden von 3—4 Zellen, sowie die für Schizosaccharomyces so eigentümlichen Tetraden und Octaden. Die einzige, wie ich glaube, konstante Verschiedenheit besteht darin, daß die Zellen einer asporogenen Gärung im Mittel etwas kleiner sind wie diejenigen einer sporogenen, doch ist auch dieser Unterschied sehr gering.

Auch in den jungen Kolonieen auf Würzegelatine und Agar sind die Verschiedenheiten noch nicht ausgeprägt, so daß die Fig. 1, welche eine sehr junge Koloniekultur von der asporogenen Form zur Ansicht bringt, nicht anders sein würde, wenn Kolonieen, vom gleichen Entwicklungsstadium aus Ascosporen hervorgegangen, photographiert wären.

Obschon die Rassenbildung (oder Polymorphie) auch bei mehreren anderen Hefearten sehr ausgesprochen vorkommt und sich dabei sowohl in dem allgemeinen Habitus wie in Bezug auf die Ascosporenbildung äußert, ist mir trotz vieler Erfahrung auf diesem Gebiete noch niemals ein Beispiel bekannt geworden, wo neben einer so prägnanten morphologischen Differenz zwischen den Rassen auch so viele, sehr bemerkenswerte physiologische Unterschiede zur Ausbildung gelangt sind wie hier.

Als solche nenne ich in erster Linie das starke Zurücktreten der Trypsinbildung bei der asporogenen Rasse, während diese Funktion, unter noch näher zu besprechenden Verhältnissen, bei der ascenbildenden Rasse sehr stark ausgebildet ist. Ich erinnere ferner an den sehr deutlichen Farbenunterschied, welcher selbst in den Sedimenten der Gärungen zu bemerken ist, durch die entschieden dunklere Farbe der vegetativen Rasse. In Bezug auf die Blaufärbung durch Jod sei bemerkt, daß diese nur an den Sporenwänden zu erzielen ist, deshalb ebenfalls bei der vegetativen Rasse nicht vorkommen kann. Im Wachstum der Kolonieen auf der Nährgelatine sind deutliche Verschiedenheiten bemerkbar. Ebenso in der nicht unbeträchtlichen Säurebildung, welche für alle drei Schizosaccharomycesarten, welche bis jetzt bekannt sind, charakteristisch ist — sie ist bei der vegetativen Rasse höher wie bei der sporogenen.

Eigentümlich ist auch, daß in den Kulturen der asporogenen Form so viele abgestreifte Zellwände vorkommen, welche bei der sporogenen Rasse fehlen, wobei sie wohl durch die Wände der entleerten Ascen ersetzt werden.

Die beste Methode, um die für Vergärung fähigen Zuckerarten festzustellen, besteht in der Auflösung von ca. 10 Proz. des zu untersuchenden Körpers in angesäuertem Hefewasser (10—20 g Preßhefe abgekocht in 100 g Wasser und klar filtriert) und Aussaat der zu untersuchenden Hefe in dieser Flüssigkeit im Gärungskölbchen[1]).

Auf diese Weise untersucht, konnte ich für beide Rassen meine früheren Angaben nur auf gleiche Weise bestätigt finden, so daß ich darauf hier nicht weiter einzugehen brauche[2]).

Uebrigens sind in dem Verlaufe der Alkoholgärung kleine Differenzen unverkennbar, so verläuft die Angärung am schnellsten bei der asporogenen, die Hauptgärungen dagegen bei der sporogenen Form.

Die Frage, ob die Entstehung der asporogenen Rasse auf unbekannten und zunächst sich dem Experiment entziehenden Verhältnissen, d. h. auf »Keimesvariabilität« beruht, oder durch »Angewöhnung« an bestimmte Lebensverhältnisse, oder auf andere Weise künstlich herbeigeführt werden kann, — diese Frage konnte ich noch nicht zu meiner völligen Befriedigung beantworten; vielleicht werde ich Gelegenheit haben, darauf später zurückzukommen. Ich wünsche hier noch hervorzuheben, daß meine Octosporushefe in morphologischer und kultureller Hinsicht ein besonders geeignetes Material darstellt für das Studium solcher Fragen überhaupt, und ich erlaube mir diejenigen Biologen, welche sich mit dem so wichtigen physiologischen Vorgange der Zellvariabilität beschäftigen, darauf aufmerksam zu machen.

Ehe ich diesen Paragraphen abschließe, noch ein Wort über die Rassenbildung bei den anderen Hefen.

Einmal darauf aufmerksam geworden, konnte ich bei Schizosacch. asporus in den Agarkulturen ohne Mühe »braune« und »weiße« Kolonieen finden, welche offenbar den weißen und den »Mischkolonieen« bei Sch. octosporus entsprechen. Dieses war um so mehr bemerkenswert, weil Sch. asporus keine Ascosporen erzeugt. Es ergab sich, daß die weißzelligen Kolonieen nur aus dicken, kurzen, die braunen sowohl aus dicken, kurzen, wie aus langen dünnen Zellen bestehen. Die weißen Zellen erzeugen in den erschöpften Kulturen viel mehr stark und unregelmäßig angeschwollene Zellen wie die braunen und machen den Eindruk, daß sie der ascenführenden Rasse bei S. octosporus entsprechen. Die so erhaltenen Rassen sind bisher konstant geblieben.

Bei Sch. pombe konnte ich »braune« und »weiße« Kolonieen ebenfalls auffinden und zugleich eine anderweitige Spaltung in zwei Rassen erzielen, wovon die eine viel mehr Sporen erzeugt wie die andere.

---

[1]) Meine Gärungskolbchen fassen in dem geschlossenen Bein ca. 25 cm^3 und sind mit aufgeschliffener Glaskappe verschlossen.

[2]) Bei dieser Gelegenheit wünsche ich zu bemerken, daß, während die Octosporushefe Rohrzucker nicht vergärt, der von Herrn Eykman in den Arakgärungen auf Java entdeckte Schizosaccharomyces asporus dieses wohl thut, und zwar mit ziemlich starker Intensität.

Merkwürdigerweise fand ich eine Spaltung in »braune« und »weiße« Kolonieen« bei der ersten besten Weinhefe, welche ich darauf untersuchte, doch konnte die Beziehung zur Ascosporenbildung hier nicht so deutlich festgestellt werden, so daß die Erscheinung den vorhergehenden Angaben vielleicht nicht angereiht werden kann und für eine theoretische Betrachtung, welche übrigens genügend auf der Hand liegt, fehlt mir zur Zeit noch ausreichendes Beobachtungsmaterial, um darüber etwas wirklich Interessantes und Abschließendes zu sagen.

4. Proteolytische Erscheinungen bei Alkoholhefen.

Wohl alle Alkoholhefen können unter Umständen in alten Kulturen ihre Nährgelatine zur Verflüssigung bringen. Die Eigenschaft ist jedoch bei den verschiedenen Arten außerordentlich verschieden ausgeprägt und selbst bei den Subvarietäten derselben Art oder Varietät verschieden. So finden sich in der Oberhefe der Brauerei d'Oranjeboom zu Rotterdam immer zwei solche Subvarietäten, welche sich durch große Verschiedenheit in ihrem Verflüssigungsvermögen auszeichnen. Weil dort mit Reinkulturen gearbeitet wird, und zwar auf sehr rationelle Weise, muß die Verschiedenheit sich schon nach wenigen Zellteilungsgenerationen immerfort wieder ausbilden.

Die zunächst der Erscheinung zu Grunde liegende Ursache lernte ich durch ein genaues Studium der Proteolyse bei der Octosporushefe kennen. Diese Art gehört nämlich zu den am stärksten verflüssigenden Alkoholhefen, welche es überhaupt giebt, und eignet sich durch die riesige Größe ihrer Ascen für mikroskopische Untersuchung bezüglich des Ursprunges des proteolytischen Enzyms. Ehe ich aber das hierbei erhaltene Resultat erwähne, wünsche ich die Frage zu beantworten, ob das Enzym als Pepsin oder als Trypsin bezeichnet werden muß.

Bekanntlich ist das hierbei ausschlaggebende Kriterium das Maß der Alkalinität oder der Acidität, wobei die optimale Proteolyse stattfindet. Ich habe nun zunächst die verschiedenen in der Litteratur angeführten Methoden zum Bestimmen von Pepsin und Trypsin nachgeprüft und habe schließlich als für meinen bestimmten Zweck am besten geeignet folgendes Verfahren befolgt:

Eine Lösung reiner Gelatine in destilliertem Wasser wird in gleiche Partieen verteilt und diese werden entweder mit Natriumkarbonat alkalisch gemacht, in der Weise, daß eine Präparatenreihe entsteht, welche resp. 1, 2, 3, 4, 5 und 6 cm^3 Normalsäure für die Neutralisation von 100 cm^3 des Präparates erfordern, andererseits eine zweite Präparatenreihe, welche durch Salzsäure soweit angesäuert wird, daß für 100 cm^3 der Gelatine resp. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 und 10 cm^3 Normallauge gefordert werden.

Alle diese 16 Gelatinepräparate werden nun in kleine Glasdosen zu sehr dicken Schichten ausgegossen und erstarren gelassen. Auf die so erhaltenen Platten werden gleiche Tropfen der zu untersuchenden Materialien gebracht, alle werden bei gleicher Temperatur von ca. 20^0 C aufgestellt, und es wird beobachtet, wie tief die Tropfen nach 24 Stunden eingesunken und wie weit sie sich seitlich ausgedehnt haben, wobei eine sehr hübsche Scala entsteht. Es hat sich ergeben,

daß das Verfahren außerordentlich genaue Messungen erlaubt und zum Nachweise mikroskopisch geringer Quantitäten der Enzyme Vorzügliches leistet[1]).

Ich will nun noch vorher angeben, welches Resultat die bereits im Handel vorkommenden Enzympräparate, nach dieser Methode untersucht, ergeben haben. — Für das Trypsin: 1. Alle Trypsinpräparate[2]) verflüssigen die alkalischen Gelatinen und diejenigen Gelatinen mit 1 cm^3 Normalsäure pro 100; die optimale Verflüssigung tritt ein bei ca. 2—3 cm^3 Normalalkali pro 100. 2. Die besseren Pankreaspräparate verflüssigen noch, wenn auch schwach, bei einem Säuregehalte von höchstens 6 cm^3 und wird die Verflüssigung erst bei 10 cm^3 (wenn auch nicht absolut) gleich Null. — Für das Pepsin ergab sich: 1. das Optimum der Verflüssigung für die verschiedenen im Handel vorkommenden (sowie eigens angefertigten Präparate) liegt bei 3—6 cm^3 Normalsäuregehalt. 2. Bei 1 cm^3 Säure ist die peptische Wirkung sehr gering. 3. Bei alkalischer Reaktion, selbst schon bei 1 cm^3 Normalalkali findet keine peptische Verflüssigung mehr statt.

In den meisten Fällen konnte ich, wie man aus dem Vorhergehenden sieht, für den qualitativen Nachweis mit zwei Versuchen auskommen, nämlich mit einer Gelatine, welche alkalisch war, und zwar zu 2—3 cm^3 Normallauge auf 100, und einer zweiten Gelatine, welche sauer war, zu 6 cm^3 Normalsäure auf 100. Fand auf ersterer Verflüssigung statt, so mußte auf Trypsin geschlossen werden, während Verflüssigung der zweiten erst dann auf Pepsin schließen ließ, wenn auch noch bei 10 cm^3 Säure eine wenn auch geringere Verflüssigung zur Beobachtung kam.

Bei der Untersuchung der Proteolyse durch Alkoholhefen mußte ich diese vergleichende Methode deshalb wählen, weil ich von vornherein gefunden hatte, daß dieselben sowohl auf alkalischem wie auf sauerem Boden verflüssigend wirken. Inzwischen war das Resultat nicht zweifelhaft: Das Enzym aller Alkoholhefen wirkte viel kräftiger auf den alkalischen Böden wie auf den sauern und zeigt schon bei 6 cm^3 Normalsäure überhaupt keine verflüssigende Wirkung mehr. Das Enzym der Alkoholhefen gehört also zu der Gruppe der Trypsine und ist durchaus kein Pepsin[3]). Wie ich erwartete, lehrte der Versuch, daß das Hefetrypsin auch Gluten, Caseïn, Albumin und Fibrin angreift.

Ich komme nun zur Besprechung meiner mikroskopischen und anderweitigen speziellen Beobachtungen.

Das Trysin ist ein durch Agarplatten und durch Pergamentpapier sehr leicht diffundierendes Enzym, welches sich durch jene Substrate ungefähr mit der Diffusionsgeschwindigkeit der reinen Peptone (etwas langsamer wie Rohzucker) fortbewegt. Man konnte deshalb annehmen, daß dasselbe auch leicht aus den geschlossenen Zellen der Alkoholhefen nach außen treten kann, und ich bin überzeugt, daß dieses unter Umständen auch wirklich geschieht[4]). Allein meine

[1]) Für die Beobachtnng bei höheren Temperaturen habe ich ein ähnliches Verfahren ausgearbeitet, wobei ich Fibrin oder Caseïn, in Agarplatten eingeschlossen, verwende. Für meinen gegenwärtigen Zweck brauche ich darauf nicht weiter einzugehen.

[2]) Ich habe auch die lebenden Blätter von Carica papaya nach diesem Verfahren untersucht, sowie einige insektivore Pflanzen, ferner gewisse Früchte, wie Feigen etc., sowie das Fleisch mehrerer Hutschwämme, stets mit sehr scharfen Resultaten.

[3]) Mit dem Pankreastrypsin halte ich, wie gesagt, dasselbe nicht für völlig identisch.

[4]) So ist es eine bekannte und nicht unwichtige praktische Erfahrung, daß beim Brotbacken Preßhefe sehr viel besser wirkt wie Bierhefe, so daß kein vernünftiger

früheren Versuche über die Laktase der Kefirhefe hatten ergeben, daß dieses ebenfalls diffusionsfähige Enzym nur unter bisher unbekannten Verhältnissen aus den Zellen heraustritt. Auch fand ich, daß die Zymoglukase, d. i. das Enzym, welches innerhalb der Bier- und Preßhefezellen die Maltose in Glukose verwandelt, niemals nach außen tritt. Für die Bereitung sowohl der Laktase wie der Zymoglukase ist es darum notwendig, die Zellen zuvor durch Zerreiben zwischen Glasplatten oder mit Sand im Mörser zu öffnen und zu zerreißen. Ich mußte von vornherein annehmen, daß solche Verhältnisse auch bezüglich der Erzeugung des Trypsins durch die Hefezellen vorliegen könnten. Da ich ferner wußte, daß bei der angegebenen Darstellungsmethode nicht immer Zymoglukase, resp. Laktase erhalten werden, sondern daß dafür noch bestimmte, nicht gut bekannte physiologische Bedingungen realisiert sein müssen, so war ich auch für das Hefetrypsin darauf vorbereitet, daß besondere Umstände sowohl bei dessen Entstehung innerhalb der Zelle, wie beim Hervortreten desselben nach außen eingreifen könnten.

Aus der Biologie der Trypsinbildung ist nun wenigstens ein solcher Umstand viel besser bekannt wie bei den anderen Enzymen, nämlich, daß sich innerhalb der Zellen eine Vorstufe desselben befindet, das Trypsinogen [1]), welches erst bei bestimmten Bedingungen das Trypsin in Freiheit kommen läßt. Zu diesen bestimmten Bedingungen gehört aber das Absterben der Zellen auf eine durchaus nicht gleichgültige Weise. Wirft man z. B. eine lebende Pankreasdrüse in Alkohol, so ist das Trypsin verloren, denn die Zellen sterben so schnell, daß sie nicht Zeit haben, Trypsin zu erzeugen [2]). Läßt man dagegen ein Pankreas während einer Nacht in einem warmen Zimmer absterben, so hat sich am anderen Tage massenhaft Trypsin gebildet, welches aus den wässerigen Extrakten mit starkem Alkohol als sehr aktives Pulver präcipitiert werden kann.

Es scheint nun, daß dergleichen Verhältnisse ebenfalls vorherrschen bei der Entstehung des Trypsins aus den Alkoholhefezellen. Auch hier scheint ein lang-

---

Bäcker gegenwärtig mehr Bierhefe in seinem Betriebe zuläßt. Eine eingehendere Untersuchung hat mich nun Folgendes gelehrt: Beim Vermischen des eingeteigten Mehles mit Hefe wird ein wenig Trypsin in Freiheit gesetzt (also wohl — jedoch nicht sicher — aus den unverletzten Zellen). Bierhefe erzeugt viel mehr Trypsin wie Preßhefe und das Enzym wird durch diese Hefe auch in geringer Menge während der Gärung im Teige neu gebildet. Dadurch erweicht das Gluten in bedenklicher Weise. Beim »Durchschlagen« des Teiges entweicht demzufolge die Kohlensäure sofort. Preßhefe erzeugt dagegen viel weniger Trypsin und läßt das Gluten unberührt, so daß beim »Durchschlagen« die Kohlensäure nicht entweichen kann, sondern in Tausende von kleiner und kleiner werdenden Bläschen verteilt wird, welche dem Teige die gewünschte gleichmäßige »Schaumstruktur« verleihen.

[1]) Für das Trypsinogen (Zymogen) zu vergleichen: Heidenhain in Hermann, Handbuch der Physiologie, Bd. V, Teil I, 1883, p. 188. Ob das »Trypsinogen« nicht einfach identisch ist mit dem »lebenden Protoplasma« der betreffenden Pankreaszelle, ist eine Frage, auf welche ich hier nicht eingehen kann.

[2]) Die Diastase kommt dagegen gleich gut aus den mit Alkohol getöteten, wie aus den langsam absterbenden Pankreaszellen, wodurch es leicht ist, Pankreasdiastase zu bereiten, welche absolut frei von Trypsin ist, während das Umgekehrte, d. i. die Bereitung diastasefreien Trypsins aus Pankreas, nicht gelingt. Doch scheinen die Speicheldrüsen sich wieder anders zu verhalten wie das Pankreas, denn Wanen spricht von Ptyalogen in ptyalinfreien Drüsen (Centralbl. f. Physiologie, Bd. VIII, 1894, p. 211).

sames Absterben die eigentliche Vorbedingung für die Trypsinbildung zu sein, wenigstens lehrt das Mikroskop, daß Kulturen mit viel Trypsin stets viel tote Zellen enthalten und daß die Vermehrung beider stets parallell geht. Das Absterben muß jedoch auf eine ganz bestimmte Weise stattfinden. Wird frische Hefe — ob Octosporushefe oder irgend eine andere Art, ist gleichgiltig — getötet durch plötzliches Einwerfen in Alkohol, so ist das Trypsin ebenso sicher verloren wie bei dem gleichen Versuche mit der Pankreasdrüse. Findet dagegen ein langsames Zereiben mit Sand im Mörser statt, so kann, wenn das Zerreiben nur lange genug dauert, eine schwache Trypsinbildung konstatiert werden. Bei meinen oben angedeuteten Versuchen zur Darstellung von Zymoglukase habe ich dann auch immer nebenbei Hefetrypsin in geringer, jedoch in sehr abwechselnder Menge erhalten.

Bei weitem das beste Verfahren, um das Enzym zu bekommen, ist, die Kulturen auf Nährgelatine altern zu lassen, wobei die Gelatine verflüssigt und eine neutrale, alkalische [1]), oder sauere Flüssigkeit erhalten wird, woraus sich Trypsinpräparate von beträchtlicher Wirksamkeit darstellen lassen. Alle solche Kulturen ergeben bei kultureller und mikroskopischer Untersuchung, daß darin massenhaft tote Zellen vorkommen, welche offenbar äußerst langsam abgestorben sind, und sie lassen darüber keinen Zweifel, daß die Trypsinbildung darin als nekrobiotischer Vorgang aufgefaßt werden muß. Es scheint mir nicht aussichtlos, daß solche alte verflüssigte Kulturen sich ebenfalls besonders geeignet ergeben werden, um daraus bei Maltosehefen Zymoglukase, bei Laktosehefen Laktase zu bereiten.

Bei der Octosporushefe ergiebt sich, daß ein großer Unterschied besteht in der Menge des gebildeten Trypsins bei den früher beschriebenen beiden Rassen. Indem nämlich die Ascenbildung mit starker Verflüssigung der Gelatine gepaart geht, findet dieses bei der vegetativen Rasse kaum oder überhaupt nicht statt, solange das Wachstum der Kulturen fortdauert. Die mikroskopische Untersuchung der Präparate giebt eine zureichende Erklärung dieser Verschiedenheit, denn während in den Gelatinekulturen der sporogenen Varietät an einem Punkte Ascen entstehen, öffnen sich die an anderen Punkten schon früher entstandenen, wobei die Sporen freien Austritt erlangen. Solche sich öffnende Ascen müssen als langsam absterbende Zellen betrachtet werden und geben faktisch die besten Bedingungen für Trypsinbildung ab. Die vegetative Varietät enthält dagegen in den noch fortwachsenden Kulturen keine oder nur relativ wenige absterbende Zellen, welche darin wenigstens nicht durch einen normalen Vorgang, wie die Ausreifung der Ascen dies ist, entstehen. Erst viel später, wenn durch Erschöpfung des Kulturbodens und des Zellinhaltes ein umfangreiches Absterben der Zellen stattfindet, bemerkt man auch bei der asporogenen Octosporushefe eine reichliche Trypsinbildung, ähnlich derjenigen bei anderen Alkoholhefen, welche keine Ascosporen erzeugen.

Die proteolytische Wirkung des Hefetrypsins ist eine sehr begrenzte, d. h. es wird nur wenig des dargebotenen Proteinkörpers durch eine bestimmte Trypsin-

[1]) Die meisten Hefen oxydieren die ursprünglich etwa beigegebenen Sauren auf geeigneten Substraten mehr oder weniger vollständig, so daß man bisweilen in den alten geschmolzenen Kulturen eine schwach alkalische Reaktion in ursprünglich saueren Kulturböden beobachten kann.

menge zersetzt, — das Trypsin selbst geht dabei verloren. Dieses gilt ebenfalls für das Pankreastrypsin und das Trypsin gewisser Aspergillusarten (welche allein ich in dieser Beziehung untersucht habe). Dieser Umstand scheint mir nicht genügend durch Herrn Fermi in seiner jüngsten Mitteilung (Centralbl. f. Bakteriol. etc. I. Abt. Bd. XXII 1897. p. 1) beachtet zu sein. Jedenfalls ist der Ausdruck »antienzymatische« Wirkung des Blutserums, welchen dieser Autor verwendet, zu beanstanden, denn das Blut enthält z. B. sicher ein amylolytisches Enzym. Selbst im Urin findet sich ein solches, welches schon einen Namen hat: Nephrozymase. Auch frage ich, wo das beinahe gänzlich in den Faeces fehlende Trypsin der Darmcontenta eigentlich bleibt? Vielleicht wird Herr Fermi antworten, es wird resorbiert. Ich behaupte dagegen, daß es bei dem, vielleicht eben durch das Funktionieren verschwindet.

Bakteriologisches Laboratorium des Polytechnikums
zu Delft, 10. Juli 1897.

Figurenerklärung zu den Tafeln.

Alles gehört zu Schizosaccharomyces octosporus.

Fig. 1 (420). Gewöhnliches Aussehen der jungen Kulturen beider Rassen auf Würzegelatine.

Fig. 2 (420). Die sporogene Rasse, ausgewachsen, mit vielen in Ascusbildung begriffenen »Zelljochen«.

Fig. 3 (420). Die asporogene Rasse unter gleichen Bedingungen wie Fig. 2, ausgewachsen.

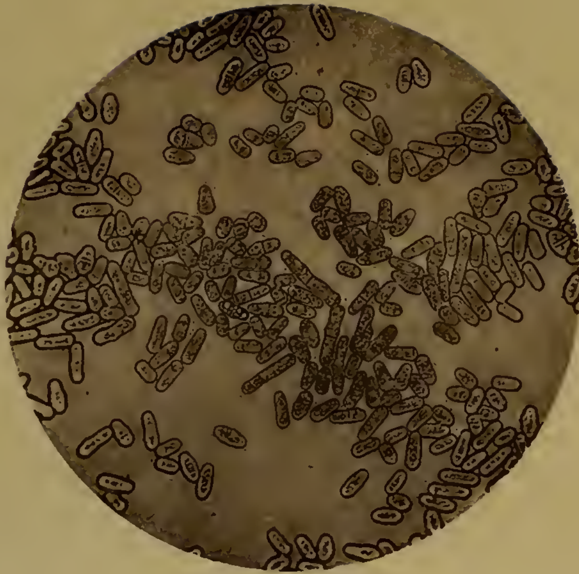


Fig. 1.

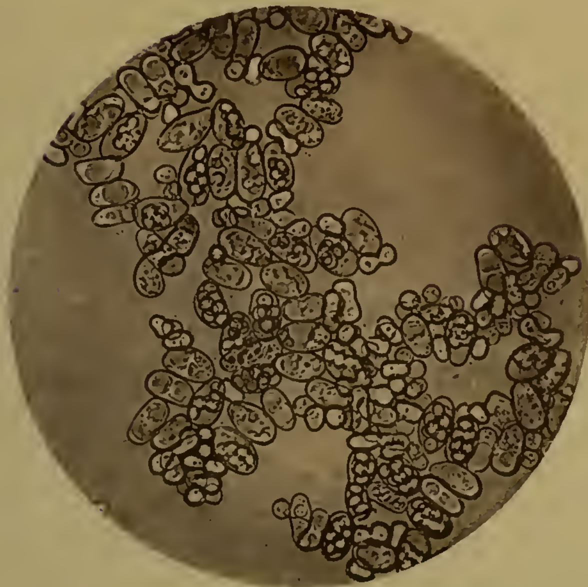


Fig. 2.

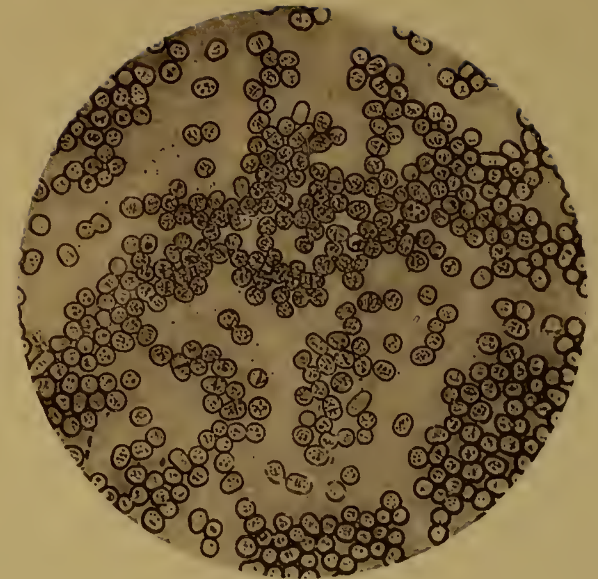


Fig. 3.

Sporogene und asporogene Rasse von *Schizosaccharomyces octosporus*.

Sur les diverses espèces de bactéries acétifiantes[1]).

Archives Néerlandaises des Sciences Exactes et Naturelles. Haarlem, Série II, Tome II. 1899, p. 180—189. — Verscheen onder den titel »Ueber die Arten der Essigbakterien« in Centralblatt fur Bakteriologie und Parasitenkunde, Jena, II. Abteilung. IV. Band, 1898, S. 209—216.

Du moment que dans l'étude d'une fonction bactérienne quelconque on ne se contente pas d'une souche issue d'une seule culture pure et propagée par les méthodes ordinaires, mais qu'on revient souvent aux sources naturelles, pour isoler de nouveau la forme cherchée, on trouvera dans la plupart des cas que les cultures provenant des diverses formes isolées ne se comportent pas de même aux points de vue morphologique et physiologique. On est en conséquence placé dans la nécessité de créer de nouvelles variétés ou espèces: de contrôler toujours avec prudence les résultats obtenus par d'autres auteurs au moyen des bactéries que l'on croit, sur la foi des descriptions, avoir entre les mains; enfin de ne jamais oublier que la bactériologie n'est pas encore sortie de sa première période: la période descriptive.

Ces circonstances sont, d'une manière générale, très défavorables au progrès de cette science, mais particulièrement à »la bactériologie physiologique«. En effet, s'il est déjà très difficile de décrire d'une manière exacte et claire des formes fluctuantes, la difficulté augmente encore quand il s'agit d'étudier et de décrire des fonctions très variables.

L'étude des bactéries acétifiantes a montré qu'ici ces difficultés existent à un très haut degré. Il y a peu d'années encore, on croyait que la faculté de fabriquer de l'acide acétique ne revenait qu'à une seule espèce bactérienne. Les expérimentateurs ultérieurs se sont vus forcés de créer des espèces nouvelles; si bien qu'aujourd'hui le nombre des formes auxquelles on reconnait le rang d'espèce est déjà monté à sept. Ce nombre devra être considérablement augmenté si les auteurs continuent à créer une nouvelle espèce du moment qu'une nouvelle particularité héréditaire quelconque semble y autoriser, ce qui conduira certainement au décuple des espèces aujourd'hui reconnues[2]), on peut être à un nombre bien

[1]) Traduction d'une communication faite le 24 avril 1897 à Delft, au 5e congrès néerlandais des sciences naturelles et médicales. (Voir les »Handelingen« p. 263. Harlem, Kleynenberg, 1897.)

[2]) Il est vrai que cette »pulvérisation des espèces« dont la bactériologie souffre actuellement à un degré si aigu, a été appliquée aussi par quelques auteurs aux organismes plus élevés. Je rappelle, pour ce qui concerne les plantes, ce qu'ont tenté Jordan,

plus grand encore. Or comme on perd ainsi la notion classique de l'espèce, telle que l'a établie Linné, il me paraît que l'on devra ici aussi en revenir si possible à l'établissement de groupes aisément définissables, qui pourront embrasser des séries de variétés. Ces groupes de variétés prendraient donc, tout comme ils l'ont toujours fait dans la classification des végétaux et animaux supérieurs, le rang d'espèces.

Les très nombreuses variétés que j'avais déjà pu distinguer dès le début de mes recherches sur les bactéries acétifiantes, j'ai tâché de les réunir en groupes susceptibles d'être considérés comme espèces, et dans lesquels on pourrait aisément introduire des variétés nouvellement découvertes.

Je ne tardai pas cependant à rencontrer une difficulté que je n'ai pu encore complètement écarter jusqu'ici; elle consiste en ce qu'il y a des »bactéries acétifiantes« qui ne fabriquent pas de vinaigre.

Aussi longtemps que je voyais apparaître dans mes cultures des formes pareilles, en suite d'une variation spontanée d'individus indubitablement issus de vraies bactéries acétifiantes, la parenté systématique demeurait naturellement tout à fait hors de doute. Mais si ces formes avaient été isolées de stations naturelles, appartenant avec plus ou moins de vraisemblance à ce groupe, naissaient des difficultés de nature diverse[1]). Je dois donc renoncer provisoirement à m'occuper de ces formes et avouer que dans le caractère de la fabrication d'acide acétique il y a un certaine manque de généralité qui empêche probablement la classification en espèces réellement naturelles. Cependant l'expérience m'a appris que ce caractère peut dans tous les cas servir avec succès à établir un »groupe d'espèces physiologiques«.

Quant à l'indication des groupes spécifiques que j'ai finalement été amené à considérer bien établis, je me bornerai ici à citer les quatre espèces principales, que j'ai jusqu'ici reconnues suffisamment caractérisées. Les variétés qui s'y rattachent ainsi que la bibliographie sont données en détail dans la thèse de doctorat que M. D. P. Hoyer a préparée dans mon laboratoire, et dont un extrait fait suite à la présente notice.

Les quatre espèces principales sont les suivantes:

1. *Bacterium aceti* Pasteur, la bactérie de l'acétification rapide (Schnellessigfabrikation), vivant à la surface des copeaux de bois de hêtre dans les cuves[2]).

2. *B. rancens* n. sp., la bactérie du vinaigre de bière; je rapporte à cette espèce à la fois la forme cultivée et les nombreuses variétés sauvages[3]);

Gandoger et leurs successeurs; mais ces auteurs ont justement fourni la preuve convaincante de la stérilité de leur méthode.

[1]) A ces »bactéries acétifiantes« qui ne fabriquent pas d'acide acétique appartiennent à mon avis plusieurs bactéries que l'on trouve dans le vinaigre de table.

[2]) Des variétés quelque peu aberrantes du *B. aceti* ont été rapportées par M. Lindner à un genre particulier, le *Termobacterium*, dont M. Zeidler a décrit récemment une forme sous le nom de *T. aceti*.

[3]) Deux des nombreuses variétés du *B. rancens* ont été décrites par M. Henneberg sous les noms de *B. oxydans* et *B. acetosum*. M. Hansen a par erreur donné à cette espèce le nom de *B. aceti*, de même M. Brown. Ni l'un ni l'autre de ces deux auteurs ne connaissaient le *B. aceti* Pasteur.

3. *B. Pasteurianum* Hansen, comprenant les bactéries du vinaigre de bière qui se colorent en bleu par l'iode additionné d'acide iodhydrique[1]);

4. *B. xylinum* Brown, les bactéries qui contribuent énergiquement à la perte en acide acétique du vinaigre. Elles forment des membranes résistantes[2]).

Il est vrai qu'à mon avis le *B. Pasteurianum* n'est guère plus qu'une variété du *B. rancens*, ce qui résulte entre autres du fait que les stries d'inoculation du *B. Pasteurianum* sur la bière gélatinée donnent assez souvent des ramifications qui ont perdu héréditairement la propriété de se colorer en bleu par l'iode et se comportent à tous les points de vue comme le *B. rancens*. Seule la propriété très caractéristique de se colorer en bleu par l'iode et le fait qu'il s'agit ici d'une forme généralement reconnue comme spécifique m'ont amené à lui maintenir le rang d'espèce, malgré que de nombreuses variétés indubitables du *B. rancens* présentent entre elles des différences aussi grandes que celles sur lesquelles on a fondé l'espèce *B. Pasteurianum*.

En déterminant les quatre espèces ci-dessus j'ai tenu compte de tous les caractères que j'ai rencontrés jusqu'ici chez les bactéries acétifiantes. Ceux-ci sont de nature si différente, que certains d'entre eux, quand on néglige l'acétification, pourraient servir à créer d'autres groupes physiologiques de bactéries. C'est ainsi p. ex. que plusieurs variétés de *B. xylinum* pourraient être rapportées au groupe physiologique des »bactéries mucipares«, qui toutefois devrait renfermer aussi de nombreuses autres formes de bactéries qui ne sont pas acétifiantes. D'autres caractères, auxquels on reconnait actuellement une grande importance dans la division en espèces des bactéries acétifiantes sont, à ce que l'expérience m'a appris, si extrêmement variables et tellement sous la dépendance des conditions externes, que je n'ai pu en faire usage pour caractériser ni les variétés ni les espèces. J'ai peu à peu appris à reconnaitre comme un excellent caractère de distinction la propriété de former des voiles à la surface des liquides nutritifs, ou l'absence de cette propriété[3]).

---

[1]) M. Hansen a décrit comme nouvelle »espèce« le *B. Kützingianum*, mais d'après sa description, cette forme n'est qu'une variété difficile à distinguer du *B. Pasteurianum*. Je connais encore nombre d'autres variétés du *B. Pasteurianum* bleuissant par l'iode, que j'ai isolées de l'eau de canal, de bières à fermentation haute ou basse, et qui se distinguent beaucoup plus de la forme principale que le *B. Kützingianum*, sans que je puisse leur accorder la signification d'espèces.

[2]) C'est à cette espèce que se rapportent les belles recherches de M. Bertrand sur l'oxydation de la glycérine etc. Ici se range aussi le *Leuconostoc Lagerheimii* Ludwig, qui constitue la plus grande masse du mucilage dans la gommose des chênes vivants.

[3]) Des voiles peuvent être formés à la surface de liquides en fermentation, ou en général de liquides acides alcooliques, par quatre groupes différents d'organismes. On distingue, d'après Nägeli, très rationnellement les types suivants:

1° des voiles provenant de diverses formes de *Saccharomyces mycoderma* (Kahmhäute).

2° des voiles provenant de diverses formes de *Saccharomyces sphaericus* (Essigaetherhäute).

3° des voiles provenant de diverses formes de *Saccharomyces torula* (Torulahäute).

4° des voiles provenant de bactéries acétiques (Essighäute)

Sur des liquides alcalins ou neutres, avec ou sans alcool, divers autres microbes

Aussi ai-je continué mes recherches dans ce sens, et j'ai cherché les substances nutritives naturelles ou artificielles qui fussent les plus propres à donner à cet égard des résultats constants.

Je reconnus ensuite que divers sucres, surtout le sucre de canne, appartiennent aux meilleur réactifs propres à distinguer les diverses espèces de bactéries acétifiantes. Car celles-ci ne sont pas seulement très différentes par leur propriété de former aux dépens de sucre un acide spécial, l'acide gluconique — propriété étudiée par M. Boutroux et plus en détail par M. Brown — mais encore par les grandes différences, aisément reconnaissables, dans le développement, qui distinguent les espèces en présence de sucre. Ce qui est très remarquable, c'est le plus ou moins de facilité avec laquelle les espèces forment aux dépens de sucre, un mucilage ou de la cellulose. Ce sont surtout le saccharose et le glucose, mélangés de peptone ou d'asparagine comme nourriture azotée, qui peuvent donner des cultures très volumineuses. Il est facile de montrer qu'il peut à cette occasion prendre naissance de la cellulose pure; et M. Brown en a fourni la preuve probante chez le *B. xylinum*, ainsi nommé à cause de la couche cellulosique résistante, souvent très coriace, qui constitue en grande partie la membrane formée par ces bactéries à la surface des liquides appropriés. Sèche, cette membrane acquiert les propriétés d'un papier très fin, très blanc, mais pas très résistant[1]).

Outre chez le *B. xylinum*, la présence d'une substance de nature cellulosique se laisse constater chez de nombreuses variétés du *B. rancens* et du *B. Pasteurianum*. Mais dans les deux cas la substance cellulosique est de nature plus molle que chez le *B. xylinum*, et fait que, surtout chez certaines variétés du *B. rancens*, il se forme sur les liquides nutritifs approprié un mucilage bactérien véritable. C'est à un pareil mucilage qu'il faut attribuer certaines formes de »bière filante«; c'est une raison analoque qui explique aussi la dégénérescence mucilagineuse du tan dans les tanneries; peut être aussi dans certains cas le »vin filant«[2]). Malgré que ce mucilage n'est que fort peu développé chez le *B. Pasteurianum*, il n'y a pas de doute qu'il existe cependant, et c'est à cela qu'il faut attribuer la réaction bleue de l'iode. J'ai eu quelque peine à établir ce dernier fait. Je reconnus bientôt qu'il ne peut être question de granulose, car la coloration bleue ne prend pas naissance par l'iode seul, mais réclame en même temps la présence d'acide iodhydrique: d'autre part, le mucilage bleuissant n'est pas attaqué par la diastase. Comme dans la préparation microscopique les corps bactériens prennent une teinte brune, tandis que les intervalles deviennent bleus, il fallait se demander si le corps bleuissant devait être considéré comme membrane cellulaire solide ou comme mucilage sécrété sous forme liquide. Pour décider ce point, j'essayai de séparer le corps bleuissant des bactéries par diffusion. L'étude détaillée des cultures sur gélatine

peuvent former des membranes, dont les plus connues sont celles des bactéries du foin, formées sur une infusion de malt ou de foin. Les diverses espèces d'*Oïdium* et d'*Endomyces* appartiennent aussi aux microbes membranogènes typiques, p. ex. sur le lait.

[1]) Un fabricant de vinaigre de mes amis en a fait faire des cartes de visite.

[2]) Le fait que les maladies appelée »bière filante« et »vin filant« ne peuvent être attribuées que rarement aux bactéries acétifiantes tient à ce que ces liquides sont ordinairement trop pauvres en oxygène pour permettre le développement de ces bactéries, qui sont énergiquement aérophiles. Aussi ces maladies sont-elles provoquées d'habitude par des ferments plus ou moins anaérobies, surtout par certains ferments lactiques mucipares.

de certaines variétés du *B. Pasteurianum*, qui en présence du saccharose forment une grande quantité du corps bleuissant, m'a montré que cela est en effet possible: le mucilage diffuse, quoique lentement, jusqu'à une assez grande distance, dans la gélatine et l'agar. Les réactions que l'on peut donc observer avec le mucilage en totale absence de bactéries ont conduit à la certitude que ce corps est une modification particulière de la cellulose, qui, il est vrai, est unique par sa diffusibilité, mais rappelle cependant à beaucoup de points de vue les membranes cellulaires des graines de diverses Légumineuses, de la capucine etc., chez lesquelles l'iode et un peu d'acide produisent également une coloration bleue intense. La diastase n'a aucune influence. Le mucilage du *B. Pasteurianum* a moins de rapports avec la substance de la paroi des asques des Lichens et la paroi des spores du *Schizosaccharomyces octosporus*, car ces dernières substances ressemblent à la granulose, se colorent directement en bleu par l'iode pur et sont décomposés par la diastase, ce qui est également vrai de la granulose du *Granulobacter*. De tout cela il résulte que notre bactérie acétique produit un mucilage, qui il est vrai a quelque analogie avec les formes déjà connues de la cellulose, mais en diffère cependant assez pour qu'on puisse la considérer comme une nouvelle modification.

Comme le *B. xylinum* est suffisamment caractérisé par la production volumineuse de cellulose et le *B. Pasteurianum* avec ses diverses variétés par la manière de se comporter en présence d'iode, on devra chercher d'autres caractères pour distinguer entre elles les bactéries du vinaigre de bière, *B. rancens* et celles du vinaigre de copeaux, *B. aceti*.

Les deux caractères suivants se sont surtout montrés propres à cet objet. D'abord la manière de ce comporter envers le saccharose, en second lieu la propriété de fabriquer oui ou non un voile sur un liquide nutritif de la composition suivante, dans lequel l'eau de distribution ne peut pas être remplacée par de l'eau distillée:

100 d'eau
3 d'alcool
0,05 de phosphate d'ammoniaque
0,01 de chlorure de potassium [1]).

Il est remarquable que, comme l'a trouvé M. Hoyer, l'alcool ne peut satisfaire les besoins en carbone des bactéries acétiques, ce que peuvent au contraire l'acide acétique, les acétates, le glucose, ainsi que la substance organique que renferme l'eau de distribution. C'est précisement pour cette raison que l'eau de distribution peut seulement être remplacée par l'eau distillée si l'on ajoute à cette dernière une matière carbonée appropriée, de préférence un peu d'acide acétique.

Quant à l'action du saccharose, dont je parlerai maintenant en premier lieu, voici ce que j'ai trouvé: le *B. aceti* forme sur la bière gélatinée, renfermant environ 10% de saccharose, des colonies très volumineuses, consistant en une masse semiliquide mucilagineuse qui finalement peut découler da la gélatine comme un liquide très trouble. A cette occasion le saccharose est interverti. Au contraire les diverses variétés de *B. rancens* (qui n'intervertissent pas le saccharose) ou se comportent indiffé-

[1]) Ce liquide donne après ébullition et refroidissement un précipité de phosphate de calcium. Pour empêcher ceci, on ajoute quelques gouttes d'acide acétique ou d'acide phosphorique, jusqu'à ce que le précipité disparaisse.

remment, au point de vue de la croissance, envers le saccharose, ou sont même entravées par cette substance dans la sécrétion de mucilage[1]). Pour employer ce caractère de distinction entre le *B. aceti* et le *B. rancens*, il est nécessaire de comparer ces bactéries entre elles sous la forme de stries, soit sur bière gélatinée, soit sur bière gélatinée avec sucre de canne. Ceci est nécessaire parce que parmi les variétés du *B. rancens*, il y en a quelques-unes qui donnent des colonies volumineuses sur bière gélatinée mélangée de saccharose, et ne se laissent pas immédiatement distinguer du *B. aceti*. Toutefois ces variétés croissent tout aussi bien sur la bière gélantinée sans saccharose, sur laquelle le *B. aceti* ne végète que très lentement; si bien qu'une seule expérience tout au plus deux, permettent de décider à laquelle des deux espèces on a affaire.

Cependant la différence entre les *B. aceti* et *B. rancens* est bien celle qui convient à deux »bonnes espèces«, c'est-à-dire qu'elle n'est pas déterminée par une propriété unique, mais par plusieurs properiétés. Et je me trouve ainsi amené à considérer les rapports entre nos espèces et le liquide nutritif artificiel dont on trouve la composition pag. 275. Voici les faits remarquables que l'on observe: le *B. aceti* se développe parfaitement bien dans ce liquide, y forme des voiles vigoureux et cohérents et transforme aisément l'alcool en acide acétique. Le *B. rancens* au contraire ne se développe pas du tout, et le *B. Pasteurianum* se conduit tout à fait comme le *B. rancens*: c'est ce que fait aussi le *B. xylinum*.

La découverte de ce caractère m'a fait comprendre bien des choses au point de vue de la distinction spécifique entre les bactéries acétiques. La séparation du *B. aceti* des autres espèces était maintenant extrêmement facile, et de même la découverte de cette espèce dans la »mère du vinaigre« flottant sur la bière, qui consiste en *B. rancens*, mais renferme souvent quelques germes isolés de *B. aceti*. Je pus démontrer par la même occasion que les bactéries acétiques au moyen desquelles Pasteur a fait ses expériences classiques sur la nutrition azotée, ne peuvent être autres que les bactéries de l'acétification rapide. En effet, le liquide de Pasteur avait la même composition que le mien. Il en résulte que les bactéries de l'acétification rapide doivent être considérées comme le *B. aceti* Pasteur, et que les bactéries du vinaigre de bière n'ont pas été étudiées par cet auteur, ou seulement par hasard et sans qui'l s'en fût aperçu. En poursuivant l'étude des facteurs produisant la différence des diverses formes sous ce rapport, j'ai trouvé que la nutrition azotée est ici la cause principale. En effet, avec de l'acide acétique comme source de carbone, les bactéries de l'acétification rapide peuvent aisément emprunter leur azote aux sels ammoniacaux; tandis que les bactéries du vinaigre de bière doivent trouver dans le substratum nutritif des peptones, attendu qu'en présence d'acide acétique elles ne peuvent emprunter l'azote nécessaire ni aux nitrates, ni aux sels ammoniacaux, ni aux amides. Le *B. Pasteurianum* se conduit au point de vue des besoins d'azote comme le *B. rancens*, tandis que le *B. xylinum* ne peut pas, il est vrai, avec la même source de carbone, prendre l'azotte aux combinaisons ammoniaques, mais bien aux peptones et aussi aux amides.

[1]) Les formes du *B. Pasteurianum* se comportent comme le *B. rancens*, à l'exception d'une variété qui ne vit que submergée (c'est-à-dire ne formant pas de membrane), que je nomme *B. Pasteurianum* var. *colorium*, et dont le développement est peu, mais distinctement favorisé par le saccharose. M. Hoyer donnera de plus amples détails sur l'interversion du sucre de canne.

L'azote des peptones n'est pas seulement assimilé par les bactéries du vinaigre de bière, mais encore très bien par les bactéries de l'acétification rapide. C'est là dessus que repose le fait que ces dernières peuvent former aussi des membranes sur la bière. Mais si on laisse les bactéries du vinaigre de bière en concurrence avec les premières, ce sont les organismes de la bière qui l'emportent. On peut ainsi réussir à faire dominer le *B. rancens* après avoir ensemencé de la bière stérilisée d'un mélange de cette éspèce avec le *B. aceti*.

M. Rueb à Rotterdam a eu l'obligeance de me laisser contrôler ces résultats en grand dans sa fabrique de vinaigre très bien montée. Nous ne pûmes qu'à grand' peine obtenir de chétives membranes du *B. aceti* sur le liquide destiné à la fabrication du vinaigre de bière [1]). Bientôt d'ailleurs ces dernières bactéries furent, malgrée toutes les précautions, supplantées par les bactéries du vinaigre de bière, qu'il n'y a pas moyen d'éliminer [2]).

Les bactéries acétiques dont je me suis servi dans ces expériences ont été isolées des copeaux d'une cuve d'acétification [3]) ; je les reconnus comme des organismes acétifiants très énergiques, quand on les cultive sur le liquide renfermant de l'alcool et du phosphate ammoniqué ; ils y forment avec grande facilité des voiles d'un blanc de neige, cohérents. Comme les bactéries du vinaigre de bière ne se développent pas du tout sur ce milieu, le concurrence ne peut permettre qu'aux bactéries de l'acétification rapide d'y végéter.

Poursuivant ces recherches, j'ai examiné la manière dont se comportent les diverses espèces en présence de sels ammoniacaux comme source d'azote, quand on leur offre comme nourriture carbonée non seulement de l'acide acétique ou des acétates, mais en outre du glucose, du saccharose, de la mannite ou de la glycérine. Dans ces conditions, les besoins d'azote se modifient totalement. C'est ainsi que p. ex. les *B. rancens* et *B. xylinum*, en présence de glucose, empruntent aussi leur azote aux sels ammoniacaux, et même quoique plus difficilement, aux nitrates. Nous nous trouvons donc conduit à ce résultat remarquable, que la nature de la nourriture carbonée Les démonstrations plus detaillées de ce fait seront fournies dans le travail de M. Hoyer.

Je ferai remarquer en terminant que la concurrence, telle que j'en ai fait usage pour distinguer les bactéries de l'acétification rapide de celles du vinaigre de bière, nous fournit un moyen général et trop peu apprécié jusqu'ici, de distinguer des espèces voisines, aussi quand elles appartiennent à des groupes de microbes tout autres que celui de bactéries acétiques.

---

[1]) Un moût clair, préparé au moyen de malt et de seigle, non bouilli, mais soumis immédiatement à la fermentation, puis transformé en vinaigre de bière par ensemencement artificiel d'une bactérie du type *rancens*. Dans cette industrie essentiellement hollandaise, longtemps avant que Pasteur ne découvrît les bactéries acétiques et n'édifiât là-dessus une nouvelle méthode de fabrication du vinaigre, cette »nouvelle méthode« avait donc déjà trouvé son application pratique.

[2]) J'ai nommé *B. rancens* var. *zythi* la bactérie industrielle du vinaigre de bière.

[3]) Sur les copeaux se rencontrent deux formes du *B. aceti*. La forme principale, *B. aceti*, est immobile; la variété est un micrococque mobile, que je nomme *B. aceti* var. *agile*.

Sur la régénération de la faculté de produire des spores chez les levûres en voie de la perdre.

Archives Néerlandaises des Sciences Exactes et Naturelles, Haarlem, Série II, Tome II, 1899, p. 269—289. — Verscheen onder den titel »Ueber Regeneration der Sporenbildung bei Alkoholhefen, wo diese Funktion im Verschwinden begriffen ist« in Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde, Jena, II. Abteilung, IV. Band, 1898, S. 657—663, 721—730.

C'est un phénomène bien connu que des levûres alcooliques fraichement isolées de leurs stations naturelles laissent voir souvent une grande tendance, au début, à former des spores, et perdent peu à peu cette tendance dans les transports ultérieurs, sans avoir subi aucune influence particulière. C'est surtout chez les levûres dites sauvages que ce phénomène s'observe fréquemment. Les causes amenant la perte d'une fonction si importante n'ont pu être encore exactement déterminées. On trouve, il est vrai, dans la bibliographie, quelques données suivant lesquelles on pourrait, chez certains microbes, annuler la faculté de sporulation, mais je passerai ces travaux sous silence, désirant m'en tenir aux métamorphoses qui s'accomplissent d'elles mêmes dans les cultures. Il me parait d'ailleurs que le sujet des influences artificielles sur la variabilité ne saurait être utilement abordé qu'aprés avoir suffisamment établi, quelles sont, dans les conditions normales, les phénomènes d'hérédité, et ceux de la „variabilité germinative" [Keimesvariabilität), déjà présente dès l'abord. Or je n'ai pu rien trouver là-des-sus chez les auteurs, et je me propose de combler jusqu'à un certain point cette lacune.

Moins encore que la perte de la sporulation, trouve-t-on mentionné le moyen de régénérer cette faculté ; c'est-à dire de retransformer une levûre qui ne produit presque plus des spores, quoique provenant d'ancêtres à sporulation très active, en une forme qui ait réacquis cette dernière propriété. J'ai entrepris des recherches sur diverses levûres pour résoudre ces deux questions, et je suis arrivé à quelques résultats que je me propose de communiquer ci-dessous. J'y fus conduit par l'extraordinaire évidence des phénomènes offerts par le *Schiz. octosporus*, qui me mit dans la bonne voie. Je commencerai donc par rappeler la régle élémentaire que j'ai découverte pour cette levûre, savoir que des cellules asporogènes reproduisent, d'une manière constante, uniquement des cellules asporogènes, tandis que les spores donnent naissance à la fois à des cellules asporogènes et sporogènes[1]).

---

[1]) *Centralbl. f. Bakteriol.*, II. Ab., Bd. III, 1897, p. 455.

Je ne savais pas encore à cette époque, — ce que je puis communiquer à présent[1]), — que cette règle trouve son application indépendamment de la culture, c'est-à-dire que dans la nature également il prend naissance des cellules sporogènes et asporogènes. La formation de celles-ci n'est donc pas provoquée par nos méthodes de culture, mais doit reposer sur des circonstances d'ordre interne, par suite sur des excitations nées de processus protoplasmiques inconnus. Les basses températures et l'appauvrissement du substratum nutritif favorisent la multiplication des cellules asporogènes chez notre levûre; mais il est bien établi que ces facteurs ne peuvent leur donner naissance. Comme les cellules végétatives sont dispersées par groupes entre les cellules sporogènes, dans les stries de nos cultures, on peut par un processus de sélection involontaire ou volontaire en provoquer la multiplication dans les séries de transports successifs, et donner ainsi l'illusion que la perte du pouvoir de sporulation repose sur un phénomène de variabilité.

Chez les autres levûres alcooliques, aussi bien chez le *Schizosaccharomyces pombe* que chez les espèces de *Saccharomyces*, les choses ne se passent pas tout à fait de même que chez le *Schizosaccharomyces octosporus*, en ce sens qu'on n'y rencontre pas deux, mais plusieurs espèces de cellules, qui au point de vue de la sporulation présentent une série d'intensités différentes. Cependant ici aussi j'ai pu constater la règle suivante: que des colonies issues de spores donnent aussi des spores; plus il y a de spores dans une colonie, plus il se forme de spores dans ses descendants; enfin des cellules issues de colonies qui ne forment pas de spores donnent naissance à des colonies asporogènes.

On voit donc qu'il s'agit ici d'un simple phénomène d'hérédité, et la question de savoir pourquoi les levûres dites sauvages des brasseries produisent si fréquemment des spores en grande quantité, devra être résolue dans ce sens qu'elles ne se forment pas aux dépens de cellules végétatives, mais de spores. Cela est du reste évident quand on songe que les spores restent vivantes dans les tourailles des malteries, tandis que les cellules végétatives y sont tuées. La poussière qui s'introduit dans les caves de fermentation et qui provient en majeure parti du moût ou de la farine de moût, contiendra donc plus de spores que de cellules végétatives des levûres alcooliques[2]).

Cette règle comprend aussi la solution du problème de la régénération du pouvoir de sporulation perdu, ou la comprend tout au moins en principe; la difficulté se trouve ramenée à distinguer les colonies issues de spores et non de cellules végétatives; et en second lieu à reconnaître les unes à côté des autres les colonies riches et pauvres en spores. Il va de soi que l'on doit par les deux voies se trouver ramené aux mêmes colonies.

Je tâcherai à présent de résoudre séparément les trois questions suivantes:

---

[1]) Je parle ici en m'appuyant sur un grand nombre de nouvelles cultures pures, obtenues, en partant de divers matériaux, par la méthode de dessiccation à haute température. Par cette méthode, j'ai découvert, outre la forme principale, encore une variété nettement distincte du *Schizosaccharomyces octosporus*, qui se conduit, à l'égard de la sporulation, tout comme la forme type.

[2]) Je ne parle pas ici des levûres de bière, dont les cellules végétatives sont très résistantes à l'égard de la dessiccation prudente à haute température.

Comment peut-on, dans le développement des levûres, reconnaitre macroscopiquement que les colonies sont issues de spores? Comment la cellule de levûre est elle amenée à en former? A quoi reconnaîtra-t-on macroscopiquement des colonies renfermant des spores? Ces trois questions, surtout la première et la troisième, sont évidemment très étroitement liées entre elles; je crois cependant pratique de les traiter isolément.

I. Quand peut-on, dans le développement des levûres, conclure que les colonies sont issues de spores?

Les méthodes de culture au microscope, permettant d'obtenir des colonies en partant des spores, sont évidemment de nulle valeur ici, car il ne s'agit pas de suivre avec beaucoup de patience une seule colonie issue d'une spore unique, mais de l'ensemencement de centaines ou de milliers de spores et de la comparaison d'autant de colonies, issues de ces spores. Je connais actuellement deux moyens permettant d'arriver à ce but d'une manière indirecte; c'est d'abord de tuer dans les matériaux d'ensemencement toutes les cellules végétatives; en second lieu de chercher dans les colonies en voie de formation certains caractères, appartenant en propre à la germination des spores.

La destruction des cellules végétatives, le spores restant vivantes, a réussi sur une ancienne lignée de *Saccharomyces Ludwigii*, isolée en août 1894 de la sève découlant d'un chêne. Cette descendance avait depuis perdu presque complètement le pouvoir de former des spores. Par dessiccation très prudente et lente à 50° C. pendant plusieurs heures, je réussis à obtenir aux dépens d'une culture qui ne formait que quelques spores isolées, par ensemencement sur moût gélatiné, un nombre de colonies correspondant à peu près au nombre des spores, comptées au microscope. Comme ces colonies étaient aussi riches en spores que la souche primaire, et que j'avais pu constater en outre que des cultures privées de spores avaient été complètement tuées dans une expérience analogue, l'unique conclusion possible était que seules des spores avaient pu germer. Je suis arrivé au même but en me servant de deux autres levûres, et je crois que cette méthode, bien appliquée, se montrera d'une application générale; cependant il faudra dans chaque cas particulier chercher la durée de dessiccation et la température convenable. Chez la levûre de la panification (*Saccharomyces panis*) [1]) je n'ai pu tuer les cellules végétatives, même à une température de 100° C., sans endommager les spores elles-mêmes; et comme cela s'applique aussi aux autres levûres, je crois que la durée de la caléfaction entre plus en ligne de compte que la hauteur de la température. Cette question a une certaine importance, et je me propose donc de l'examiner dans l'avenir plus en détail. J'ajouterai encore que je m'étais d'abord

[1]) La plupart des auteurs rapportent la levûre panifiante au *S. cerevisiae*. Je croyais moi-même auparavant que cette levûre devrait être rapportée au *S. ellipsoideus*. Pasteur y vit une espèce spéciale, qu'il désigna sous le nom de »levûre caséeuse«. Je veux suivre actuellement l'exemple de Pasteur.

proposé en pasteurisant (chaleur humide) un mélange de spores et de cellules végétatives chez la levûre du pain, d'isoler les spores à l'état vivant, mais je ne pus y réussir. Les spores ne survivaient pas aux cellules végétatives. J'essayai aussi divers réactifs, tels que l'iode, le sublimé et le phénol, ainsi que diverses matières colorantes fortement antiseptiques, telles que l'acide picrique et le bleu de méthylène, dans l'espoir que ces substances pénétreraient dans les cellules végétatives et les tueraient, avant d'agir sur les spores; mais jusqu'ici ce fut sans résultat. Je crois cependant que des recherches ultérieures dans ce sens ont chance de réussir.

J'ai déjà dit antérieurement comment la dessiccation à haute température peut servir à séparer les genres *Schizosaccharomyces* et *Saccharomyces*, quand ces deux formes se rencontrent ensemble sur les fruits secs du Levant. Je me contenterai d'observer ici que ce moyen est fondé sur la bien plus grande résistance des spores chez le premier genre. Il y a de plus que les autres levûres, à ce qu'apprend l'examen direct au microscope, ne sont d'ordinaire représentées sur les fruits que par leurs cellules végétatives, et même dans un état de grande débilité, ce qui les rend plus sensibles à la dessiccation que si elles sont bien nourries. Elles meurent rapidement sur les fruits, et leurs spores, qui ne font jamais complètement défaut, donnent lieu dans les fermentations non purifiées à un développement si tardif, qu'elles ne parviennent plus à prendre le pas sur le *Schizosaccharomyces*, ou qu'on a tout au moins l'occasion, par transport de la jeune culture sur une plaque de moût gélatiné, d'isoler le *Schizosaccharomyces*. Il va de soi qu'on observa également dans ce dernier cas les autres levûres, et j'ai trouvé parmi ces dernières quelques formes dignes d'intérêt, dont une représente un terme de transition entre les deux genres ci-dessus cités. J'isolai de plus dans ces expériences une nouvelle espèce de *Schizosaccharomyces*, voisine de la levûre *S. pombe*. Je suis donc autorisé à recommander ma méthode comme d'une grande utilité à divers points de vue; elle permet non seulement la régénération des spores chez certaines espèces, mais encore la découverte de formes sporogènes nouvelles.

En appliquant la méthode de dessiccation à chaud pour régénérer les spores, j'ai dans certains cas obtenu un résultat inattendu. Je vis notamment chez certaines levûres, — et peut-être même s'agit-il d'une règle générale, — apparaître entre les colonies à sporulation abondante d'autres colonies à cellules asporogènes; mais de plus ces dernières cellules étaient remarquablement petites. Chez la levûre du pain (*S. panis*) une race à petites cellules fut tout ce que me donna la méthode, attendu que les spores de cette espèce ne semblent pas plus résistantes que les cellules végétatives. Une étude plus approfondie m'apprit que la plupart des levûres que j'examinai peuvent donner des races dont les cellules se distinguent par leurs dimensions, et que les races à petites cellules sont bien plus résistantes à l'égard de la dessiccation que les formes à grandes cellules. Je reconnus encore qu'il n'est pas question ici d'une variation des cellules, provoquée par la haute température, mais que les petites cellules existent déjà dès l'abord, et transmettent héréditairement leurs caractères; si bien que la dessiccation à chaud n'opère qu'une simple sélection, sans provoquer l'apparition de formes nouvelles. Je reviendrai ci-dessous, en parlant du *S. uvarum*, sur ces particularités.

Il est rare que l'on puisse, au début du développement, décider directement

par voie macroscopique si une colonie déterminée s'est formée aux dépens d'une spore. Le meilleur caractère sous ce rapport consiste dans la germination retardée des spores quand on la compare à celle des cellules végétatives. Cela fait que dans les cultures sur substratum solide, c'est surtout parmi les retardataires dont les colonies restent ordinairement petites parce qu'elles ne se développent que dans un milieu en grande partie épuisé, qu'il faudrait chercher les colonies issues de spores. Or si les spores et les cellules étaient toujours séparés dans les matériaux d'ensemencement, on pourrait obtenir une image très fidèle de leur nombre relatif dans les cultures, attendu qu'il y dominerait deux dimensions des colonies. Malheureusement la plupart des spores restent réunies en tétrades, et la colonie qui en résulte se développe au début quatre fois plus vite qu'une colonie issue d'une spore unique. De plus, les sporanges sont souvent semés en petits groupes, tantôt purs, tantôt mélangés de cellules végétatives. Ces dernières aussi adhèrent les unes aux autres chez beaucoup d'espèces de levûres; et toutes ces circonstances font que beaucoup de colonies issues de spores sont déjà de bonne heure arrivées au même degré de développement que des colonies issues de cellules végétatives isolées. D'autre part, il y a de grande différences de dimension entre les colonies retardées conduit si souvent à la production de cultures à régénération complète des spores, qu'on ne saurait douter qu'elles sont elles-mêmes issues de spores. Il est d'ailleurs évident, comme on sait que les colonies issues de spores présentent une sporulation plus abondante que celles issues de cellules végétatives, que les moyens auxquels on reconnaît les colonies spécialement riches en spores permettent de conclure aussi qu'elles en sont issues. Ces moyens seront indiqués ci-dessous.

2. Comment amène-t-on la cellule de levûre a former des spores?

La sporulation est un phénomène de croissance dans des cellules abondamment nourries, qui s'épuisent en présence d'air. Dans la plupart des cas, il faut à cet effet le contact immédiat de l'atmosphère, l'air dissous dans le liquide nutritif étant insuffisant; c'est seulement chez le *Schizosaccharomyces octosporus*, fraîchement isolé de son milieu naturel, que dans beaucoup de cellules la tendance à la sporulation est si grande, que cette dernière a lieu même dans les cellules submergées[1]). Il résulte de la nécessité du contact de l'air que dans les colonies et les stries la sporulation commence par s'opérer en surface, pour progresser ensuite lentement en profondeur. Chez les espèces pauvres en spores, la sporulation reste souvent localisée à la surface des colonies; chez celles qui sont riches en spores au contraire, comme *l'octosporus* p. ex., les spores peuvent finalement se rencontrer dans toute la masse des colonies; mais toujours la sporulation est au début superficielle. Les moyens par lesquels on force les levûres à sporuler sont quelque

[1]) Cultivée comme levûre »à air« (»Lufthefe« des Allemands, »luchtgist« des Hollandais) cette espèce est aussi productive que la levûre de la panification, et ne donne guère que des sporanges et des spores; si l'on ne fait pas passer de l'air dans les cultures elle est beaucoup moins productive, et alors le grande masse des cellules demeure à l'état végétatif, mais a cependant une tendance à sporuler.

peu différents suivant le but a atteindre. On peut se proposer da forcer chaque cellule isolément à donner des spores, sans lui laisser le temps ni l'occasion de se diviser ou de bourgeonner préalablement; ou bien on favorisera cette multiplication, afin de poursuivre la sporulation dans les gemmes ou les colonies qui en résultent. Dans le premier cas il faut un contrôle au microscope, dans le second on fera usage de certains auxiliaires macroscopiques dont je parlerai plus loin.

Pour observer la sporulation de la cellule de levûre isolée, il faut, après une nutrition abondante, la soumettre à un épuisement complet. Les méthodes un peu surannées de M. Reess avec les tranches de carotte ou les petits blocs de plâtre et d'argile ne m'ont jamais donné de résultats bien satisfaisants dans ce genre de recherches. Je me sers simplement d'»agar pur« dissous dans l'eau distillée, et refroidi de la manière ordinaire dans des éprouvettes inclinées. S'il ne s'agit pas de forcer chaque cellule individuelle à sporuler, mais que quelques bourgeonnements préalables sont permis, on peut se servir aussi d'agar ordinaire, dissous dans l'eau de la canalisation. J'entends par »agar pur« l'agar du commerce après extraction complète des corps solubles au moyen d'eau distillée. Voici comment on obtient cette extraction; on dissout 2%, d'agar dans de l'eau distillé bouillante, on filtre, et on verse en couche mince dans une cuvette. Après solidification, on coupe la plaque en tranches minces que l'on soumet à un lavage de plusieurs semaines dans de grands flacons bouchés, en renouvelant fréquemment l'eau distillée. Les corps solubles diffusent complètement dans l'eau, et l'on se trouve en possession d'»agar pur«. Il y a en même temps un fort développement de bactéries, qui accélère indubitablement l'extraction. Les bandes sont alors de nouveau fondues dans un petit ballon et on en remplit les éprouvettes. On étend la levûre à étudier en couche mince sur la surface inclinée d'agar, et l'on porte le tout à l'étuve à la température voulue. Si le substratum est suffisamment préparé, les cellules se mettent aussitôt à former des spores, sans bourgeonner au préalable. On n'élèvera pas trop la température, et l'on abandonnera les cultures pendant un certain temps. Une température de 21—25° C. est suffisante pour les levûres acooliques ordinaires. Chez le *Schiz. octosporus* on peut accélérer le phénomène en élevant la température à 28—30° C., mais on ne fait ainsi qu'abréger le temps nécessaire, attendu que tôt ou tard, au-dessus des 20° C., la même proportion s'établit entre cellules sporogènes et asporogènes. En effet, c'est ce qu'on doit attendre, puisqu'il ne s'agit que d'une qualité héréditairement fixée.

L'observation de la sporulation dans les colonies et les stries réclame encore moins de préparation que dans les cellules isolées. Je ferai remarquer aux débutants que le processus peut parfaitement être distingué dans les cultures âgées sur gélatine. Si toutefois il se fait une protéolyse trop intense, accompagnée d'immersion des colonies, ce qui empêche la sporulation, il est recommandable d'ensemencer sur moût mélangé d'agar ou parfois sur bière à l'agar. Sur ce dernier milieu il se fait évidemment un bourgeonnement moins intense que sur moût à l'agar; de plus le contenu cellulaire reste plus clair, ce qui à mon avis repose sur le fait que dans les cellules cultivées sur le moût à l'agar il se forme plus de gouttelettes de graisse que sur la bière à l'agar, pauvre en sucre. Ces dernières cultures seront donc à préférer pour la photographie et en général pour les recherches cytologiques.

3. Quelles sont les propriétés macroscopiques caractéristiques pour les colonies sporogènes ?

J'ai exposé ailleurs[1]) comment on peut distinguer les colonies en sporulation des colonies végétatives dans les cultures âgées sur moût à l'agar du *S. octosporus*. Les premières sont blanches et restent blanches; les autres ne sont blanches qu'au début et brunissent plus tard. Sur moût gélatiné, les colonies sporulantes de cette espèce se reconnaissent à ce qu'elles liquéfient rapidement, tandis que chez les colonies aspores la protéolyse ne débute que beaucoup plus tard et n'atteint pas à beaucoup près l'intensité qu'elle prend chez les premières. La réaction iodée rend cette différence particulièrement évidente: les colonies sporulantes, au contact de l'iode, prennent une teinte bleu noirâtre, tandis que les autres restent incolores. Comme on pouvait s'y attendre, les autres levûres se comportent autrement, car, ainsi que j'ai déjà eu l'occasion de le dire, il ne se forme pas chez elles deux formes de colonies nettement séparées comme chez le *Schiz. octosporus*, mais plusieurs qui diffèrent les unes des autres par l'intensité graduelle de la sporulation. Cependant même ici on peut dans bien des cas distinguer les colonies les unes des autres à l'oeil nu ou à la loupe, en se servant de plusieurs propriétés, différentes suivant les espèces. Celles qui, à mon avis, se prêtent la mieux à cette distinction se laissent résumer dans les trois règles suivantes:

1. Les cellules en sporulation se distinguent des autres au moyen de la réaction iodée; les spores se colorent en bleu par une teneur en granulose de la paroi, tandis que les cellules végétatives restent incolores; ou bien ces dernières, par suite de la présence de glycogène, prennent une teinte brun violet par l'iode, tandis que les cellules sporogènes restent incolores (*S. uvarum*): ou enfin la sporulation se caractérise par l'accumulation de glycogène dans les cellules sporogènes et les spores, qui en conséquence se colorent par l'iode, tandis que les cellules asporogènes sont privées de glycogène (S. [*Mycoderma*] orientalis) et restent donc incolores.

2. Les colonies sporulantes liquéfient d'ordinaire bien plus rapidement le moût gélatiné que les colonies non sporulantes.

3. Les colonies en sporulation sont souvent d'un blanc pur, tandis que les autres ont une teinte brun sale. Je montrerai que ces faits sont en rapport avec les dimensions de cellules.

Je crois qu'il vaudra mieux montrer la valeur de ces caractères par quelques exemples spéciaux.

4. Premier exemple: Sporulation chez le Schizosaccharomyces Pombe. (Pl. II, figs. 1 et 2).

Comme les *Schiz. pombe* et *octosporus* appartiennent au même genre, on pouvait s'attendre à ce que la première de ces deux formes renfermerait comme la seconde de la granulose dans la paroi des spores, et se colorerait donc en bleu

[1]) *Centralbl. f. Bakter.*, l. c.

par l'iode. Le *Schizosaccharomyces* est de plus toujours privé de glycogène, et je m'attendais donc à un contraste très marqué entre les colonies privées de spores et sporulantes. C'est en effet ce qui a lieu.

J'ai fait usage dans mes expériences de la levûre décrite par M. Lindner[1]), et qu'il a eu l'obligeance de m'envoyer[2]). Au moment où les échantillons me parvinrent ils renfermaient si peu de spores, que la plupart du temps le champ du microscope n'en montrait pas: les stries sur moût gélatiné se colorèrent en jaune par l'iode.

J'ensemençai sur moût gélatiné, ce qui me donna un nombre suffisant de colonies pour que quelques-unes, à ce que m'avait appris l'examen au microscope des matériaux d'ensemencement, en renfermassent plusieurs issues de spores[3]), et j'abandonnai ces colonies à elles-mêmes pendant trois semaines à un mois. Les cultures étaient renfermées dans des boites de verre, ce qui me permettait de verser dessus une solution diluée d'iodure de potassium iodé, et de la laiser pénétrer peu à peu dans les colonies. Je décantai prudemment, faisant en sorte que les colonies ramollies ne se liquéfiassent pas, ce quie ne réussit pas complètement. Je comparai ensuite la teinte des colonies à la loupe. Il se montra que parmi un millier environ de colonies incolores il y en avait quelques-unes qui montraient des stries ou des points bleu foncé. L'examen au microscope m'apprit que les colonies jaunes étaient privées de spores, tandis que les colonies striées et ponctuées étaient nettement plus riches en spores que les matériaux d'ensemencement. Une deuxième culture, faite en partant de ces spores, donna un bien plus grand nombre de colonies bigarrées et quelques colonies très-petites, qui noircirent complètement par l'iode, tout autant que les colonies en sporulation du *Schiz. octosporus.* Ces petites colonies consistaient, à leur surface libre, à peu près complètement en cellules sporulantes. Malgré que le lavage à la liqueur iodée les eût recouvertes de cellules asporogènes des colonies voisines, elles donnèrent cependant après un nouveau transport des cultures extrêmement riches en colonies sporogènes.

Je pus par la même occasion faire usage d'un autre caractère que la réaction iodée, pour opérer une sélection ultérieure. Je m'aperçus que la sporulation abondante n'était plus en ce moment restreinte à quelques petites colonies retardataires[4]), mais était également apparue dans les grandes colonies normalement développées. Comme je l'ai déjà exposé antérieurement[5]), ces colonies ont la

[1]) *Wochenschr. f. Brauerei*, Bd. X, 1893, p. 1298. Voir aussi Rothenbach, *Zeitschr. f. Spiritusindustrie*, Bd. XIX, 1896, p. 58

[2]) Je cultive encore une deuxième variété très remarquable (ou peut être une nouvelle espèce), que j'ai isolée moi-même par la méthode de dessiccation de fruits de l'Orient, et qui est plus riche en spores que la levûre pombe originale. Je ne l'ai pas encore étudiée en détail.

[3]) La méthode de dessiccation m'a permis d'obtenir aussi chez cette espèce une accumulation des spores, mais cela n'a guère d'importance dans la discussion actuelle.

[4]) Les spores germent ici aussi, à ce qu'il semble, plus tardivement que les cellules végétatives. C'est donc surtout parmi les petites colonies à développement tardif que nous devrons en chercher qui soient issues de spores au début des expériences.

[5]) L'opinion que j'ai antérieurement émise suivant laquelle la protéolyse est, chez les levûres alcooliques, un phénomène de nécrobiose, s'est trouvée confirmée dans les

propriété de liquéfier rapidement la gélatine, en suite de la mort du contenu cellulaire lors de la sporulation. Les colonies renfermant des spores se distinguent donc dès ce moment même sans l'emploi d'iode. Ceci permet d'éviter que des cellules des colonies asporogènes voisines ne viennent se déposer sur les autres lors de la décantation, et la sélection peut donc s' opérer bien plus sûrement. La race riche en spores ainsi obtenue ne peut être durable sans sélection continue; si l'on néglige celle-ci quelque temps, les transports successifs accumulent peu à peu la race pauvre en spores, jusqu'à ce qu'elle ait finalement supplanté la première. Ceci dépend évidemment de ce que dans les cultures sans sélection il y a toujours plus de la moitié des cellules qui appartiennent à la race asporogène, ce qui doit finir par amener la suprématie de cette race. Chez le *Schiz. octosporus*, les rapports sont renversés, et c'est donc la race sporogène qui l'emporte.

On peut donc grâce à ce procédé augmenter considérablement la production de spores chez le *Schizosaccharomyces pombe*, mais on parlera peut-être plus justement ici d'une accumulation que d'une régénération des spores.

Une culture en milieu solide de la levûre pombe, obtenue en partant des spores, est après traitement par l'iode un objet extrêmement propre à montrer l'existence de la »variabilité germinative«. Non seulement on est frappé tout de suite par le contraste de coloration présenté par les colonies pauvres et riches en spores, mais un examen attentif des colonies sporulantes au moyen d'une forte loupe apprend que les cellules asporogènes, toujours présentes, sont réunies en groupes, contrastant souvent sous forme de stries rayonnantes incolores, qui s'élargissent vers la périphérie, avec le fond bleu de la colonie. En les suivant jusqu'à leur origine, on s'aperçoit qu'elles ne se continuent pas jusqu'au centre, mais débutent seulement au delà de la demi-longueur du rayon, souvent même encore bien plus vers l'extérieur. Cela semble devoir faire conclure que ces groupes cellulaires ne naissent qu'assez tard, de manière que l'excitation à laquelle ils doivent leur origine aura probablement quelque rapport avec l'épuisement des cellules mères. D'autre levûres m'ont montré des phénomènes analogues.

---

observations ultérieures, et peut être considérée comme mise hors de doute. C'est ce dont on peut aisément se convaincre par l'expérience suivante: on recouvre partiellement d'une solution diluée d'iode des colonies d'une levûre lentement liquéfiante et très cohérente, la levûre panaire p. ex., développée sur une plaque au moût gélatiné. Au lieu d'iode, on peut avoir recours à un autre poison; mais on laissera l'iode en contact avec la levûre jusqu'à ce que la teinte du glycogène montre qu'il a pénétré dans les cellules. On décante prudemment, ce qui a pour effet de laisser à la surface des colonies une couche de cellules tuées par l'iode. Au bout de quelques jours, on s'apercevra que la gélatine est liquéfiée sous toutes les colonies renfermant des cellules mortes, tandis qu'elle reste encore longtemps solide dans la portion de la plaque non touchée par l'iode.

Dans ces derniers temps M. H. Will a décrit dans la *Zeitschr. für Brauwesen*, T. 21, pag. 127, 1898, plusieurs faits qui corroborent ma manière de voir, quoiqu'en dise M. Will lui-même.

5. Deuxième exemple: Régénération des spores chez le Saccharomyces uvarum. Apparition de races microcellulaires par la dessiccation a chaud. (Figs. 3 et 4. Pl. II).

Chez certaines levûres, la dessiccation a conduit non seulement à la séparation d'une race faiblement et d'une race fortement sporulante, mais encore à ce résultat inattendu qu'on voit apparaître des races de levûres formées de cellules de petites dimensions. Je rendrai compte d'une manière détaillée de ce que j'observai dans un cas particulier.

En Hollande, probablement comme ailleurs, le jus de groseille fortement additionné de sucre entre assez souvent en une vive fermentation, qui peut même faire éclater les flacons qui le renferment. J'isolai en mars 1894 les microbes d'un pareil flacon, rempli de jus provenant de groseilles du »Westland«[1]), que j'avais acheté dans un magasin de Delft. J'y trouvai plusieurs espèces, mais surtout une levûre du maltose très active, que je nomme *Saccharomyces uvarum*[2]) et une levûre sporulante productrice d'éther acétique, qu'il faut rapporter au *S. sphaericus* Nägeli[3]).

Au début, le *S. uvarum* formait presque dans chaque cellule, dans les cultures ordinaires sur moût gélatiné, quatre spores, et se montrait donc appartenir aux levûres les plus fortement sporulantes. Cependant le pouvoir de sporulation disparut de plus en plus dans les transports successifs, et quand je commençai mes expériences de régénération, je ne pus qu'à grand peine découvrir quelques spores isolées. Cependant j'ai réussi depuis à me procurer de nouveau, en partant de ces dernières, la souche primitive abondamment sporulante: j'ai fait usage de la dessiccation à chaud, de la sélection de colonies très tardives, restant très petites, dans lesquelles je pouvais précisément pour ces raisons attendre des spores, en troisième lieu de la sélection de colonies d'un blanc pur, entremêlées aux colonies végétatives plus brunâtres, et finalement de la réaction à l'iode, qui montra que le glycogène est utilisé dans la production des spores, tandis qu'il se conserve dans les colonies non sporulantes. Je crois probable que dans la sporulation le glycogène est transformé et déposé dans la paroi des spores sous forme d'une modification cellulosique qui ne se colore pas par l'iode. Je fais cette hypothèse en me fondant sur l'analogie avec le *Schizosaccharomyces*, où les matériaux de réserve se déposent dans la membrane sous forme de granulose.

---

[1]) Le »Westland« est la région côtière de la province de Hollande méridionale, le long de la Mer du Nord, renommée par son horticulture.

[2]) Je considère cette levûre comme une espèce réellement indigène de la flore hollandaise, c'est-à-dire capable d'y vivre en plein air. Les vraies levûres du maltose y sont cependant rares; je n'en pourrais citer avec certitude, outre le *S. uvarum*, que deux espèces. Malgré de nombreuses tentatives, je n'ai pu encore jusqu'ici décider si la levûre panaire (*S. panis*), si abondante dans les canaux des villes hollandaises, y est réellement indigène. A la campagne, cette espèce ne se rencontre pas dans le levain, mais y est remplacée par le *S. minor*.

[3]) Voir mon travail sur les levûres éthacétiques dans les »*Handelingen van het 5e Nederl. Natuur- en Geneeskundig Congres*«, 1895, p. 301.

Il n'y eut pas moyen, par la méthode de dessiccation à haute température, de tuer complètement les cellules végétatives sans endommager en même temps un grand nombres de spores. Cependant je pus arriver par cette voie à une telle accumulation de spores, que la sélection ultérieure des colonies me conduisit au but sans difficulté aucune. J'obtins toutefois ici encore une race à petites cellules, un fait sur lequel je reviendrai par la suite.

La sélection des colonies naines retardataires, provenant des matériaux soumis à la dessiccation, fut entreprise sur les plaques au moût gélatiné, et ne réclame plus guère d'autre explication. Ces mêmes plaques peuvent également servir à la sélection au moyen de la réaction iodée du glycogène.

La différence de teinte entre les colonies végétatives et sporulantes n'est bien nette que dans les cultures sur plaques à l'agar. La sélection réussit également bien sur le moût à l'agar et la bière à l'agar. Il s'agit d'opérer au moyen d'une bonne loupe et sous un éclairage approprié; mais une fois qu'on a saisi la différence, on ne s'y trompe plus. Chez cette levûre, c'est en effet la couleur des colonies qui fournit le meilleur caractère distinctif, ce qui tient à ce que la différence de taille entre les spores et les cellules végétatives est si considerable, bien plus considérable que chez les autres levûres. Il va de soi que l'on peut parallèlement avoir recours à la réaction iodée, qui colore en jaune les colonies sporogènes, en brun foncé au contraire les colonies végétatives, qui sont riches en glycogène. C'est par exception seulement que je trouvai des colonies brunes à grandes cellules, renfermant néanmoins beaucoup de spores. Mais celles-ci, comme on pouvait s'y attendre, restèrent incolores sous l'action de l'iode, attendu que le glycogène y avait disparu[1]).

C'est en opérant la sélection d'après la couleur que je découvris les races de levûres microcellulaires, avec leurs propriétés si curieuses. Ayant obtenu après la dessiccation à chaud, prolongée dans certaines expériences pendant un quart d'heure à 100° C.[2]), une forte réduction des colonies »brunes«, tandis que je croyais n'avoir dans les »blanches« que des colonies sporogènes, je m'aperçus à l'examen microscopique que ceci était une erreur. Les colonies blanches appartenaient à deux catégories, les unes sporogènes, les autres asporogènes et microcellulaires. Poursuivant ceci, je constatai que c'est la taille des cellules qui régit la coloration des colonies et par suite leur résistance à la dessiccation. Les colonies microcellulaires sont blanc pur, indifféremment que les cellules soient petites par suite de la sporulation, qui réduit chaque cellule (spore) au quart de sa taille primitive, ou qu'elles aient par elles mêmes cette propriété. La moindre résistance des grosses cellules rappelle la nature plus délicate du tissu turgescent (cellules somatiques) des plantes supérieures, comparées aux méristèmes microcellulaires (cellules embryonnaires), lesquels, comme ne l'ignore aucun botaniste, supportent beaucoup mieux la gelée et la dessiccation. Cette différence repose évidemment

[1]) C'est évidemment un cas de variabilité, que je considère toutefois comme »variabilité germinative«, et non comme le résultat direct d'une action de milieu quelconque.

[2]) Je ferai remarquer que seules les cellules abondamment nourries supportent longtemps des températures si élevées. Les cellules mal nourries sont très sensibles à l'effet combiné de la chaleur et de la dessiccation, et meurent déjà en masse vers 56° C.

sur la presence de grosses vacuoles dans les grandes cellules, et leurs petites dimensions ou leur absence dans les petites cellules et les spores. La dessiccation ou la gelée font du contenu vacuolaire une solution concentrée, qui agit probablement d'une manière très nuisible sur le protoplasme. Comme la faculté d'avoir de petites cellules se transmet héréditairement tout comme la faculté de la sporulation, la méthode de la dessiccation chaude doit donc donner ou une race microcellulaire, ou une race abondamment sporogène, ou les deux à la fois. On peut donc ici recevoir l'impression fausse qu'une métamorphose dans la taille des cellules s'est opérée par une action extérieure, qui en réalité ne se réduit qu'à une sélection masquée. La chaleur ne fait pas naître une variation, mais lui donne l'occasion de devenir évidente, en modifiant les conditions de concurrence. Ce n'est donc pas d'une propriété acquise qu'on pourra parler, ici pas plus qu'ailleurs, mais de variabilité »germinative«. Cet exemple montre en même temps combien on doit être prudent en voulant apprécier ce qu'on suppose être des influences directes sur la variabilité, quand on n'en sait pas assez con^ernant les circonstances de l'hérédité.

Je répéterai que dans mes expériences sur la levûre panaire (*S. panis*), ayant pour put d'accumuler la formation des spores, je n'obtins jusqu'ici que des races microcellulaires, qui toutefois ne se montrèrent pas très constantes, et se retransformaient bientôt en la forme à grandes cellules, si l'on ne continuait pas la sélection.

Ce que j'ai dit du *S. uvarum* montre que je n'ai pu reconnaitre les colonies sporogènes à leurs phénomènes protéolytiques. Cependant je m'étais attendu au début à un autre résultat chez une espèce si abondamment sporulante, et voici comment je crois devoir expliquer le fait.

Comme je l'ai déjà avancé, la protéolyse est à mon avis un phénomène de nécrobiose, c'est-à-dire qu'il dépend de la mort plus ou moins avancée des cellules. Il faut donc que les cellules sporogènes, quand le protoplasme non employé à la formation des spores périt, agissent sur les albuminoïdes. Or cette opinion a été confirmée par de nouvelles recherches et peut être actuellement considérée comme hors de doute. Cependant j'ai reconnu que le protoplasme des cellules mères des spores, en tant qu'il ne sert pas à la production de ces dernières, ne meurt pas toujours. Il ne reste pas seulement vivant chez le *S. uvarum*, mais les cellules mères des spores peuvent elles-mêmes bourgeonner au moment de la germination des spores. Il va de soi que toute raison pour qu'il y ait protéolyse tombe par là même, sans pouvoir faire douter au fait essentiel que la protéolyse est un phénomène nécrobiotique.

Je ferai encore remarquer finalement que le *S. uvarum* offre une différence physiologique remarquable entre les fermentations opérées en partant des spores et celles provoquées par la race pauvre en spores. Dans du moût de 10° Balling, on verra à 28° C. une »fermentation sporogène« se continuer régulièrement juqu'à ce que le saccharimètre marque 3—4°. Une »fermentation végétative« au contraire, après avoir débuté énergiquement, s'arrête déjà vers 7—8° Balling; les levûres descendant au fond et, quel que soit l'intervalle de temps qu'on laisse écouler ensuite dans les conditions présentes, il n'y a plus de modification. Si cependant on expose les mêmes ballons à une température beaucoup plus basse,

p. ex. 15—20° C., la fermentation recommence, continue aussi énergiquement qu'une fermentation »sporogène«, et le saccharimètre descend également à 3—4° B. Nous observons donc ici la circonstance remarquable que les spores sont adaptées à une plus haute température que la race végétative, et je crois que la raison immédiate en doit être cherchée dans un besoin plus intense d'oxygène chez cette dernière que chez la race sporogène.

6. Troisième exemple: Régénération des spores chez le Mycoderma orientalis (figs. 5 et 6).

Je choisis comme troisième exemple une levûre appartenant aux mycodermes et que j'appellerai *Saccharomyces* (*Mycoderma*) *orientalis*. J'ai déjà fait connaissance avec cet organisme il y a quelques années, grâce à M. Eykman, qui résidant alors à Tokio me l'envoya sous le nom de »koji blanc«[1]), comme un des matériaux de la fabrication du saké. Je l'ai retrouvé plus tard à diverses reprises sur les fruits d'Orient, surtout sur les raisins secs de Turquie, où on les trouve à l'état de spores. Sans doute, cette forme n'y est pas générale, et se développe seulement dans les fermentations postérieures ou de bout, mais à ce qu'il m'a semblé alors sans exception. On l'obtient le plus aisément comme suit. Des raisins secs turcs, tels qu'on les achète dans les magasins de denrées coloniales sont introduits dans du moût de bière, acidulé jusqu'au titre 3—5 cm.^{3} d'acide normal pour 100 de moût, au moyen d'acide lactique, et on abandonne dans l'étuve à 28° C. Il s'établit une fermentation alcoolique, provoquée par plusieurs espèses de levûres[2]), qui se rencontrent sur les raisins secs sous forme de cellules végétatives. Quand la fermentation cesse, et si l'on a fait usage de suffisamment de raisins secs, la surface se recouvre d'un voile de *Mycoderma orientalis*, très-sec et pulvérulent et d'une couleur blanc pur. Déjà ce voile impur renferme une masse de spores[3]). La levûre isolée se montre être une levûre du glucose. Dans l'eau de levûre additionnée de glucose elle donne lieu à une fermentation très vive, dans le moût de bière à une fermentation médiocre, qui dure aussi longtemps qu'il y a du glucose en présence. Dans ce dernier liquide de culture il prend naissance de grosses bulles d'air sous la membrane, qui se développe vigoureusement. Le maltose ne fermente pas mais est oxydé par le voile si l'air a suffisamment accès, et sert à la croissance.

Le *Mycoderma orientalis* éveilla mon intérêt par la protéolyse, exceptionnellement intense pour une levûre alcoolique, qu'il provoque dans les cultures sur gélatine

---

[1]) Cette substance se composait de riz, complètement envahi par le champignon et recouvert par lui. L'échantillon me parvint en juin, à une température extérieure d'environ 20° C, mais la masse s'était si énergiquement échauffée par la respiration du mycoderme, que la température avait atteint 40° C. Il est clair qu'un autre champignon avait saccharifié l'amidon du riz par l'intermédiaire d'une diastase, car le *S. orientalis* lui-même n'en produit pas et n'attaque pas la fécule. La bibliographie dont je dispose ne mentionne pas le »koji blanc« dans la préparation du saké.

[2]) En partie non encore décrites.

[3]) Cette levûre est très probablement très proche parente du *S. farinosus* de M. Lindner (Betriebskontrolle, 1. Aufl., 1895, p. 214), tiré du »Jopenbier« de Danzig, et n'en est peut être qu'une variété. Il n'y a pas identité entre les deux formes, car M. Lindner ne mentionne pas de liquéfaction de la gélatine.

chaque fois qu'on l'a isolé de nouveau. Mais dans les transports ultérieurs, cette propriété disparait complètement, de sorte que l'on croit avoir affaire à une autre espèce de levûre qu'au debut[1]). En même temps se modifie le caractère pulvérulent et sec des colonies sporogènes, qui deviennent humides et gris blanchâtre, comme les colonies pauvres en spores. Poursuivant ces phénomènes de plus près, je trouvai qu'il se passe ici à peu près la même chose que j'ai déjà décrit antérieurement chez le *Schiz. octosporus*, savoir que la protéolyse suit de près la sporulation, et que cette dernière fonction cesse ainsi que la protéolyse dans les transports successifs. Une circonstance inattendue, c'est que non seulement les cellules sporogènes sont très riches en glycogène, mais que cette substance s'accumule aussi dans les spores, ce qui fait que l'iode colore les unes et les autres en brun foncé[2]). Les cellules asporogènes au contraire sont si complètement privées de glycogène que l'iode leur donne simplement une teinte jaunâtre. Ceci permet de distinguer dans les colonies sporulantes les cellules asporogènes, de les compter au microscope, et d'en faire de même dans les colonies »asporogènes« pour les rares cellules en sporulation. On voit que le glycogène se comporte ici tout autrement que chez le *S. uvarum*[3]).

Il s'agissait à présent de savoir s'il serait possible de régénérer les deux fonctions de sporulation et de protéolyse chez une ancienne souche de culture qui les avait à peu près complètement perdues. Cela m'a parfaitement réussi, et plus aisément que chez toute autre espèce de *Saccharomyses*. Le principe de la méthode est, comme partout ailleurs, le principe d'hérédité. La sélection des colonies sporogènes sur plaques de moût gélatiné est ici très simplifiée par la protéolyse intense et très hâtive. Cette sélection est encore facilitée par ce que les deux cas limites, des colonies très riches et très pauvres en spores, sont bien plus généraux que les formes intermédiaires. Or si l'on sème de nouveau les colonies sporogènes, on obtient déjà au bout de deux ou trois transports un rapport constant entre les deux espèces de colonies, avec un nombre très restreint de colonies pauvres en spores (correspondant au nombre des cellules qui ne donnent pas au microscope de réaction avec l'iode). Ces propriétés rappelent donc fortement ce qu'on observe chez le *Schiz. octosporus*.

Dans le présent cas, il était facile d'expliquer pourquoi dans les séries de cultures ordinaires il y a une si forte régression dans la faculté de sporulation. On voit en effet que la sporulation est en antagonisme avec le bourgeonnement. Or, si l'on cultive une souche à sporulation très abondante, les cellules sporogènes pro-

---

[1]) La liquéfaction par les colonies sporogénes est tout aussi intense que chez les bactéries fortement liquéfiantes.

[2]) Comme les deux races du *S. orientalis* font fermenter le glucose avec la même énergie, la fonction fermentative doit être indépendante du glycogène. C'est ce que viennent confirmer aussi d'autres faits d'observation. Le *S. apiculatus* par exemple, une levûre très énergique du glucose, est ordinairement privé de glycogène, tandis que l'*Oïdium lactis*, qui ne fait fermenter aucun sucre, est extraordinairement riche en glycogène.

[3]) Pour la bibliographie assez étendue sur le glycogène des levûres je renverrai aux travaux de celui qui l'à découvert, L. Erréra (*Compt. rend.*, T. CI. 1885, p. 253) et à ceux de son élève G. Clautriau (Etude chimique du glycogène chez les levûres, Bruxelles, 1895) ainsi qu'au »Jahresbericht« de A. Koch.

duiront precocement des spores et, comme ces spores ne germent pas immédiatement, entreront dans un stade de repos, à un moment où il y a encore suffisamment de nourriture pour permettre des bourgeonnements ultérieurs des cellules végétatives. Si l'on ignore ces circonstances, on ne transportera involontairement, dans les ensemencements successifs, qu'un grand nombre de cellules végétatives, et peu de cellules sporogènes: au bout de quelques transports ces dernières auront presque complètement disparu. Ici encore nous avons donc affaire à une sélection inconsciente des cellules plus productives, ce qui donne l'illusion trompeuse d'un phénomène de variabilité, et repose cependant, quand on y regarde de plus près, sur l'hérédité pure et simple.

Réussira-t-on à obtenir, partant de la race pauvre en spores et par voie de sélection des colonies. une race complètement asporogène (comme chez le *Schiz. octosporus*)? C'est ce que je n'ai pas encore essayé, mais il n'y a guère moyen d'en douter.

Les présentes recherches ont montré comment on peut, chez les levûres alcooliques sporogènes, revenir de matériaux de culture fortement modifiées à la souche primitive. Je crois donc que ces résultats, outre leur intérêt physiologique, ont aussi quelque valeur pour la systématique. En tout cas, ma méthode est évidemment propre à simplifier le diagnostic des espèces, si difficile dans ce groupe.

Delft, avril 1898.

Explication des photographies de la planche.

Fig. 1. *Schizosaccharomyces pombe*, culture pauvre en spores sur plaque de moût gélatiné. âgée de 25 jours (Apochromat. 2,5 mm., project. ocul. 2, Zeiss, Grossiss 440).

Fig. 2. *Schizosaccharomyces pombe*, culture sporogène, obtenue par accumulation du pouvoir de sporulation en partant de la culture précédente; âgée de 25 jours; développée sur la même plaque dans les mêmes conditions que la culture précédente (Apochromat. 2,5 mm., project. ocul. 2 Zeiss, Grossiss. 440).

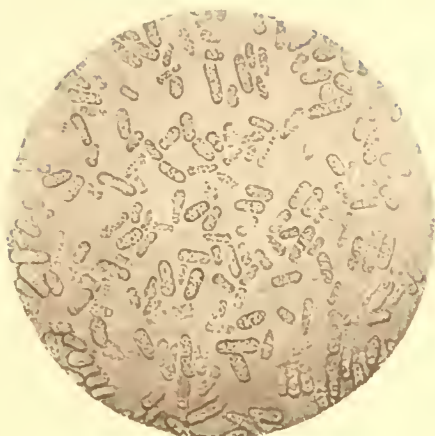
Fig. 3. *Saccharomyces uvarum*, culture pauvre en spores dans l'eau de la distribution mélangée d'agar (Apochromat. 2,5 mm., project. ocul. 2 Zeiss, Grossiss. 440).

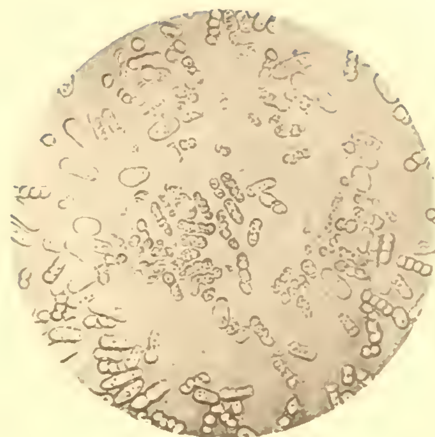
Fig. 4. *Saccharomyces uvarum*, culture sporogène dans l'eau de distribution à l'agar, issue par régénération des spores de la culture précédente (Apochromat. 2 mm. Hartnack, project ocul. 2 Zeiss, Grossiss. 560).

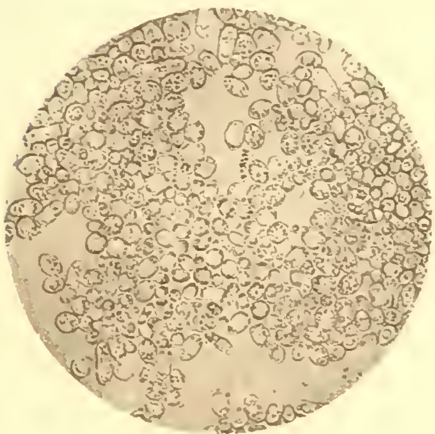
Fig. 5. *Saccharomyces (Mycoderma) orientalis*, culture pauvre en spores sur moût gélatiné (Apochromat. 2 mm. Hartnack, project. ocul. 2 Zeiss. Grossiss. 560).

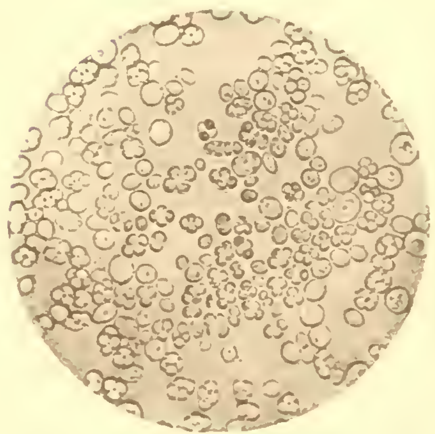
Fig. 6. *Saccharomyces (Mycoderma) orientalis*, culture sporogène sur moût gélatiné, obtenue par régénération des spores de la culture précédente (Apochromat. 2 mm. Hartnack, project. ocul. 2 Zeiss. Grossiss. 560).

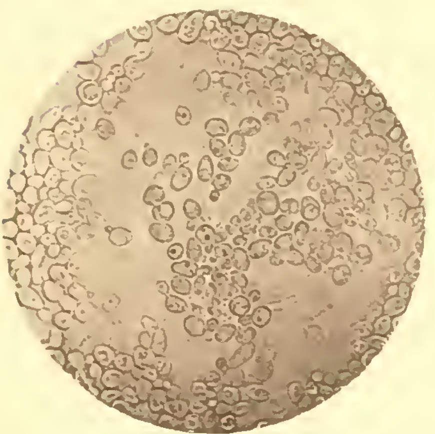
M. W. BEIJERINCK.

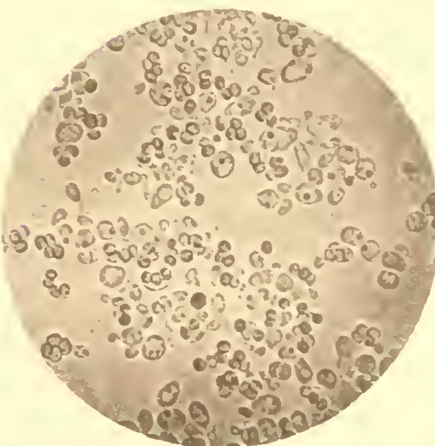

Fig. 1.


Fig. 2


Fig. 3.


Fig. 4.


Fig. 5.


Fig. 6.

Régénération de la sporulation chez les levures alcooliques.

Notiz über Pleurococcus vulgaris.

Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde, Jena, II. Abteilung, IV. Band, 1898, S. 785—787.

Pleurococcus vulgaris bildet bekanntlich den grünen Belag, welcher so ausserordentlich allgemein auf Baumstämmen und Dächern und an Mauern und Zäunen gesehen wird. Die grosse Verbreitung giebt dieser Art ein gewisses Interesse und veranlasste mich, zu versuchen, dieselbe in Reinkultur zu bringen. Dieses ist nach vielem vergeblichen Bemühen folgenderweise gelungen: Agar-Agar, lange mit destilliertem Wasser ausgelaugt, um daraus alles lösliche Organische zu entfernen, wurde zu 2 Proz. gelöst in folgendem Gemisch:

100 destilliertes Wasser,
0,05 Ammonnitrat
0,02 Kaliumphosphat,
0,02 Magnesiumsulfat,
0,01 Calciumchlorid.

In einer Platte eingegossen, wurde darüber ein wenig in Wasser fein zerriebenes Material des Belages eines Lindenbaumes für eine Kolonieenkultur gebracht, das überflüssige Wasser abtropfen gelassen und die vereinzelten, an der Agaroberfläche verklebten Keime vor einem Südfenster sich selbst überlassen. Die Platte befand sich in einer Glasdose mit gut aufgeschliffenem Deckel und wurde vor Verdunstung geschützt. Nach ungefähr 3 Wochen wurden Hunderte grüner Kolonieen sichtbar, welche eine feste Konsistenz zeigten, sich leicht in einem Stücke vom Agar abheben liessen und sich als »Sarcinaklumpen« von Pl. vulgaris ergaben. Dazwischen lagen ganz vereinzelt sehr dunkelgrüne, weiche Kolonieen, welche entweder aus einer Chlorellaart[1]) oder aus Stichococcus bacillaris bestanden. Die Versuche wurden im Winter 1896 ausgeführt; seitdem habe ich die Art fortwährend in Reinkulturen beibehalten und als vollkommen konstant und monomorph erkannt. Die anfänglichen Misserfolge der Reinkulturversuche müssen der Gegenwart löslicher organischer Stoffe in den Kulturböden zugeschrieben werden, deren Bedeutung ich zunächst unterschätzte.

Interessant ist folgender Umstand: Als die Reinkultur eben gelungen war, wurde versucht, auf die nämlichen Nährböden überzuimpfen, worauf ich seit mehreren Jahren meine anderen Grünalgenkulturen fortzüchte, nämlich auf Würzegelatine und auf

[1]) Dieselbe Chlorella findet sich oft in den chemischen Laboratorien in den Flaschen mit Natriumphosphatlösung sowie in Gipswasser. Sie bildet die Hauptmasse der sogenannten »Priestley'schen Materie« und hat einiges Interesse für die Geschichte des Dogmas der Generatio spontanea.

Fleischwassergelatine: jedoch ganz ohne Erfolg; nach kurzer Zeit verbleichten und starben die Zellen, ohne sich zu teilen. Inzwischen wurden auch Kulturen auf Agar angefertigt, nach obigem Rezept präpariert, allein weniger sorgfältig ausgewaschen. Als dann später aufs neue versucht wurde, auf Würzegelatine oder auf Fleischwassergelatine überzuimpfen, war der Widerstand überwunden, es fand Wachstum statt, und zwar in einem viel ausgiebigeren Masse wie auf dem Agar. Offenbar hatten die Zellen sich an die organischen Körper gewöhnen müssen, und anstatt dass dieselben dann länger hinderlich waren, wurden dieselben zur Nahrung verwendet und förderten das Wachstum ganz ausserordentlich. Solche Kulturen haben ein höchst auffallendes Aussehen. Indem sich nämlich die eine Pleurococcusschicht über die andere bildet, kommt bald die Zeit, wo die oberen Schichten als trockenes grünes Pulver die unteren überdecken und leicht aus den Reagenzröhren als grober Sand ausgeschüttelt werden können, — ein Verhalten, welches unter allen von mir bisher kultivierten Algen für Pleurococcus einzig ist.

Ich sagte, dass Pleurococcus sich als monomorph herausgestellt hat. Ich betone dieses, weil eben über diesen Punkt in der »British Association« im Oktober 1897 eine Diskussion zwischen Miss Dorothea Pertz und Prof. Farmer stattgefunden hat [1]), wobei die Ansicht ausgesprochen wird, dass Pleurococcus sowohl kugelige Sporangien wie Fäden erzeugt. Dieses ist sicher nicht der Fall, und da ich gegenwärtig gut abgebbare Reinkulturen besitze, bin ich gern bereit, diese auf Wunsch als Belege für meine Ansicht zu übersenden. Ich habe mit dieser Mitteilung so lange gewartet, weil ich eben ganz sicher sein wollte; da gegenwärtig meine Kulturen 2 Jahre im Laboratorium konstant geblieben sind, glaube ich zuversichtlich, sagen zu dürfen, dass sie es auch weiterhin bleiben werden.

Während Pleurococcus ein Beispiel einer Alge ist, welche anfangs, um aus der Natur in Reinkultur gebracht zu werden, dem Einfluss gelöster organischer Körper entzogen werden muss, später jedoch dadurch nicht geschädigt wird, in meinem Laboratorium eine andere, von Herrn A. van Delden aufgefundene Alge kultiviert, welche nach Jahresfrist noch ebenso empfindlich für organische Stoffe ist, wie im Anfang während der Isolierung. Es ist ebenfalls eine Grünalge, welche in den Agarkulturen zwar an Stichococcus erinnert, jedoch durch die eigentümliche Form der Chromatophoren und durch das Vorkommen eines deutlichen Pyrenoids mehr auf Ulothrix gleicht. Dieselbe fand sich in Grabenwasser und kann nur dann auf festem Boden fortgezüchtet werden, wenn dieser aus vollständig ausgewaschenem Agar mit anorganischen Salzen besteht.

Die früher von mir in diesem Blatt besprochenen niederen Algen isolierte ich auf Nährböden, welche von Anfang an ziemlich reich an organischen Körpern sind, indem sich herausgestellt hatte, dass diese Organismen in ihrem Wachstum und ihrer Reproduktion ausserordentlich durch organische Nahrung gefördert werden (Cystococcus humicola, Stichococcus bacillaris, Stichococcus major, Chlorella vulgaris, Scenodesmus acutus, Chlorosphaera limicola etc.). Sie werden dabei gänzlich unabhängig vom Licht und erzeugen, z. B. auf Malzwürzegelatine, selbst bei Fortsetzung der Kultur während mehrerer Jahre in absoluter Dunkelheit, massenhaft tiefgrünes Algen-

[1]) Nature. Vol. LVI. 1897. p. 601.

material. Inzwischen habe ich mich überzeugt, dass solche Kulturen im Lichte wieder imstande sind, sich anorganisch zu ernähren und Kohlesäure zu zerlegen. Auf diese Weise gelingt es, C h l o r e l l a , C y s t o c o c c u s und S t i c h o - c o c c u s (mit P l e u r o c o c c u s machte ich noch keine Versuche, doch wird auch dafür unzweifelhaft das nämliche gelten) entweder als Saprophyten oder als Autophyten zu kultivieren. Eigentümlich ist es, dass die Chromatophoren bei dem passiven saprophytischen Leben immer stark gekörnt sind und oft undeutlich abgegrenzt in Bezug auf das Protoplasma, bei autophytischer Ernährung dagegen glänzend und durchsichtig und sehr scharf begrenzt sind.

De l'existence d'un principe contagieux vivant fluide, agent de la nielle des feuilles de tabac.

Archives Néerlandaises des Sciences Exactes et Naturelles, Haarlem, Série II, Tome III, 1900, p. 164—186. — Een voorloopige mededeeling hierover verscheen onder den titel »Over een contagium vivum fluidum als oorzaak van de Vlekziekte der Tabaksbladen« in Verslagen Kon. Akademie van Wetenschappen, Wis-en Natuurk. Afd., Amsterdam, Deel VII, 1898, blz. 229—235. — Verscheen compleet onder den titel »Ueber ein Contagium vivum fluidum als Ursache der Fleckenkrankheit der Tabaksblätter« in Verhandelingen Kon. Akademie van Wetenschappen, Amsterdam 1898, Deel VI, No. 5.

En 1885 M. Adolf Mayer [1]) montra que la maladie dite nielle (Mosaikkrankheit ou Blattfleckenkrankheit des auteurs allemands), que présentent les feuilles de tabac, est contagieuse. Il exprima le suc de plantes malades, en remplit des tubes capillaires, et piqua au moyen de ceux-ci les feuilles et les tiges de plantes saines croissant en plein air. Au bout d'une ou deux semaines ces individus furent attaqués de la même maladie. L'auteur ne put trouver au microscope, dans les feuilles malades, ni bactéries ni parasites d'autre nature. J'étais à cette époque le collègue de M. Mayer à l'école d'agriculture de Wageningen; il me montra ses expériences, et, pas plus que lui, je ne pus déceler dans les plantes attaquées des microbes, auxquels on pourrait attribuer la maladie. Cependant mes connaissances bactériologiques étaint à cette époque trop incomplètes pour que je pusse reconnaitre à mes observations directes pleine force démonstrative.

Je me suis depuis lors continuellement occupé de recherches bactériologiques, et quand j'eus découvert en 1887 les bactéries des nodosités des Légumineuses, je repris aussi l'étude de la nielle du tabac. Mais de nouveau le résultat fut négatif. Cependant dans toutes les expériences que j'avais faites jusqu'à cette époque, c'était ou bien l'examen au microscope qui devait trancher la question, ou bien des méthodes de culture, mais qui n'avaient été appliquées qu'en vue de la présence d'organismes aérobies. Je n'était donc pas exclu que dans les tissus végétaux auraient vécu des anaérobies en petit nombre, qui, tout en se dérobant à l'observation directe, auraient cependant pu, comme p. ex. la bactérie du tétanos, attaquer les tissus voisins par l'intermédiaire de virus solubles et morts, c'est-à-dire non susceptibles de reproduction. On sait en effet que souvent les cellules des végétaux supérieurs renferment des matières colorantes réduites [2]), qui se colorent au contact de l'air, de telle sorte que l'on ne saurait nier a priori la présence d'organismes anaérobies dans les individus de

---

[1]) *Landwirthschaftliche Versuchsstationen.* Bd. 32, p. 450, 1886.

[2]) Je rappellerai p. ex. la présence d'indoxyle dans le vouède.

tabac. S'il est vrai que la presence de pareils microbes dans les organes aeriens verts de cette plante est très improbable, la découverte de la microaérophilie chez les anaérobies [1]) devait nous engager à la plus grande prudence, surtout en raison de l'importance fondamentale des faits dont il s'agit ici. Il semblait tout particulièrement désirable de faire de nouvelles recherches sur les microbes vivant dans le sol, à la surface des racines.

Mais quand je me fus donné la plus grande peine pour découvrir dans les feuilles malades ou les racines des plantes attaquées, ou dans leur voisinage immédiat, des organismes anaérobies, capables d'avoir provoqué la contagion, toujours avec un résultat négatif; et que j'eus finalement acquis la certitude que de pareils organismes faisaient réellement défaut, je ne pouvais plus douter que la nielle est une maladie infectieuse, mais n'est pas provoquée par des microbes.

Vers cette époque, en 1897, je fus en mesure de disposer du nouveau laboratoire de bactériologie de l'Ecole polytechnique de Delft. Une serre avec installation pour le chauffage y est attachée, dont je pus profiter pour continuer l'étude de la nielle. Je pus faire ainsi une série d'expériences d'inoculation irréprochables, dont je donnerai brièvement les résultats ci-dessous.

Mes plantes appartenaient surtout à la variété hollandaise d'Amerongen, mais provenaient aussi en partie de graines achetées à Erfurt [2]).

1. *L'infection n'est pas le fait de microbes, mais d'un virus vivant fluide.*

Je constatai d'abord que le suc des plantes malades, après avoir traversé un filtre de porcelaine, qui retient tous les organismes aérobies, demeure virulent. Toutefois je ne me suis pas borné à rechercher les aérobies seuls, mais je me suis astraint en outre à des expériences très délicates pour déceler des microbes anaérobies dans le suc filtrant des bougies. Toujours le résultat fut négatif, et le suc employé aux essais semblait donc parfaitement stérile.

La quantité de suc filtré nécessaire à inoculer un plant de tabac est extrêmement petite. Une gouttelette introduite au moyen d'une seringue de Pravaz au bon endroit suffit à infecter un grand nombre de feuilles et de rameaux. Le suc exprimé de parties malades permet d'inoculer un nombre indéfini de plantes saines et de leur communiquer la contagion, ce qui démontre que le virus, bien que liquide, se multiplie dans l'individu vivant.

Cependant les expériences avec le suc ayant passé les bougies restent sujettes à critique, parce que la nature corpusculaire du virus ne peut pas être par là définitivement écartée. C'est pourquoi j'ai eu recours aux expériences de diffusion suivantes, qui me semblent avoir donné à ce point de vue des résultats absolument indiscutables.

Je déposai à la surface de plaques épaisses et larges d'agar des gouttes du suc exprimé de feuilles malades, ou bien des fragments de ces feuilles écrasées. Je laissai ainsi le virus se propager dans la masse par diffusion, dans l'espoir de le séparer de

[1]) Les organismes anaérobies obligatoires ont-ils besoin d'oxygène libre? *Arch. Néerl.*, 2e série. T. II. 1890. p. 307.

[2]) Je reçus de divers côtés des plantes malades; j'en remercie ici ceux qui m'ont obligé.

cette manière de la substance foliaire et de toutes les bactéries. En effet, le virus, s'il est susceptible de diffusion, pourrait pénétrer latéralement comme en profondeur dans l'agar, abandonnant complètement toutes les particules solides, aussi bien les invisibles que les bactéries tant anaérobies qu'aérobies ainsi que leurs spores. L'expérience trancherait donc la question de savoir si le virus est réellement diffusible et par suite soluble dans l'eau; ou bien, si n'étant pas diffusible quoique extrêmement divisé, il faut cependant le considérer comme corpusculaire, c'est-à-dire comme un contagium fixe. Or, on remarque que le corps qui provoque l'infection peut pénétrer jusqu'à une profondeur assez sensible dans les plaques d'agar, comme il résulte des faits suivants.

Quand je jugeai le temps écoule suffisant pour que le virus, dans l'hypothèse de sa diffusibilité, eût pénétré à une profondeur sensible dans la plaque, je lavai cette dernière à l'eau, puis avec une solution de sublimé, et finalement, à l'endroit où avait été déposé la bouillie de feuilles attaquées ou le suc exprimé, j'enlevai au moyen d'une spatule de platine à bords tranchants une couche d'agar d'environ un demi-millimètre d'épaisseur. La masse immédiatement sousjacente fut alors enlevée en deux couches successives, et ces deux portions servirent à inoculer des plantes saines. Les résultats ne purent laisser aucun doute: dans les deux cas se montrèrent les phénomènes caractéristiques de l'infection, très-intenses avec les portions supérieures, moindres avec les portions plus profondes [1]). Au bout de dix jours le chemin parcouru par le virus aura atteint au moins deux millimètres, peut être encore plus. Bien que la diffusion ne se soit fait sentir ainsi que sur un espace de quelques millimètres, il semble néanmoins démontré par le fait même que le virus est réellement liquide ou dissous, et non corpusculaire. Ce résultat pourrait avoir un intérêt particulier en ce qu'il rend possible de concevoir une propagation analogue de corps spécifiques vitaux dans la masse des méristèmes des plantes [2]).

Le suc filtré à travers les bougies agit sur les plantes d'une manière un peu moins intense que le suc exprimé et non encore filtré. Cela résulte du fait suivant. Le suc frais ne provoque pas seulement les taches particulières, caractéristiques, de la maladie, suivies de la mort des parties panachées, — quand on emploie des quantités un peu considérables, se suc donne de plus naissance à des vraies déformations des feuilles qui restent souvent petites, parce que la nervure médiane ne se développe pas, deviennent plus ou moins lobées par suite de troubles dans l'accroissement marginal, et présentent fréquemment une nervation palmée, faisant que ces feuilles ne ressemblent plus du tout à des feuilles de tabac. Si l'on désire provoquer des déformations pareilles au moyen du suc découlant des bougies, cela est possible, mais à condition de faire usage de quantités bien plus considérables. D'où l'on conclura que le virus est retenu dans les pores du filtre, tout au moins au début de la filtration. Il serait tout

---

[1]) L'albumine d'œuf et la fécule de pomme de terre bouillie pénètrent lentement dans les plaques d'agar, ce qui se démontre aisément pour ce dernier corps au moyen de l'iode. Des gouttes d'amidon soluble, déposées sur les plaques de gélatine, diffusent beaucoup plus vite que l'amidon ordinaire, et se propagent ainsi latéralement jusqu'à une distance assez considérable.

[2]) Je suis déjà arrivé jadis à une opinion analogue pour ce qui concerne les substances cécidiogènes dans la formation des galles; ces corps doivent être également solubles dans l'eau et capables de diffuser dans les méristèmes.

à fait erroné de vouloir en déduire que le virus est de nature corpusculaire, comme le montre l'expérience suivante.

On sait que la diastase du malt se compose essentiellement d'un mélange de deux amylases, la granulase et la maltase, que l'on peut séparer l'une de l'autre par diffusion [1]). Si p. ex. on dépose une goutte d'extrait de malt sur une plaque de gélatine renfermant de l'amidon, la maltase ne tarde pas à diffuser plus rapidement que la granulase. Tandis que la maltase forme aux dépens de l'amidon de l'érythrodextrine et du maltose, la granulase donne naissance à des dextrines non colorables par l'iode et à du maltose, aux dépens à la fois de l'amidon et de l'érythrodextrine. L'action de l'iode sur le champ de diffusion du mélange des diastases pourra révéler les quantités relatives de maltase et de granulase par l'apparition d'un anneau rouge d'érythrodextrine sur champ bleu, l'anneau enveloppant le champ incolore de la granulase. Si l'on filtre le même extrait de malt à travers une bougie de porcelaine, on remarque en répétant l'expérience de diffusion avec les premières portions filtrées, que l'anneau de la maltase est beaucoup plus large. Cela montre que les pores du filtre retiennent plus énergiquement la granulase, dont la diffusion est plus difficile que celle de la maltase. Plus tard, quand les parois du filtre sont saturées de granulase, l'anneau de maltase revient à sa largeur primitive. Néanmoins la granulase est un corps très soluble dans l'eau.

Il fallait donc s'attendre à ce qu'un corps difficilement diffusible, tel que le virus, filtrerait au début sous une forme un peu diluée, sans consister pour cela en corpuscules solides [2]).

Bien que je sûs depuis longtemps que les bactéries ne sont pas directement intéressées dans l'infection, j'ai voulu cependant mettre ce point hors de doute à tous les égards. J'ai donc procédé à de nombreuses inoculations de mes individus au moyen des microbes qui se rencontraient par hasard sur les feuilles de tabac malades, ainsi qu'avec les formes qui se développèrent dans le suc exprimé. Quand les expériences étaient bien faites, j'obtenais régulièrement des résultats négatifs; jamais une culture privée de virus n'a provoqué de phénomène d'infection. Je montrerai cependant au § 9 que dans certaines circonstances il n'est pas facile de séparer complètement du virus les bactéries isolées du suc des feuilles malades. Même après transport, ces bactéries peuvent encore renfermer suffisamment de virus pour provoquer des phénomènes extrêmement remarquables (albinisme).

Si l'on veut donc faire une expérience exacte pour établir si un microbe isolé d'une plante malade n'est pas capable de provoquer la contagion, il faudra procéder à une culture en colonies en y mettant le plus grand soin, et partant des germes isolés et lavés à grande eau. Parfois même des transports répétés seront-ils nécessaires, que l'on continuera jusqu'à ce que les dernières traces du virus absorbé ou adhérent aient disparu.

---

[1]) Le troisième enzyme de l'extrait de malt, la glucase, ne s'y trouve qu'en très petite quantité.

[2]) Aussi ne saurais-je me rallier à l'opinion de M. Löffler, qui conclut à la nature corpusculaire du virus de la fièvre aphteuse (*Centralbl. f. Bacteriol.* Erste Abteilung. Bd. 24, p. 570, 1898).

Il serait intéressant de savoir si les solutions aqueuses d'or et de platine, préparées par M. Bredig au moyen de l'arc électrique, entre des électrodes de ces métaux, passent les pores des bougies, et peuvent diffuser dans la gélatine ou la gelée d'agar.

Je crois que les observations précédentes ont leur utilité. J'y vois notamment une analogie avec ce que l'expérience a appris en pathologie, savoir que les agents de certaines maladies infectieuses perdent leur virulence par la culture en dehors de l'organisme, mais sont capables de l'augmenter par le passage répété d'animaux sensibles. L'analogie il est vrai n'est pas très étroite mais me semble cependant indubitable.

2. Seuls des organes végétaux en voie d'accroissement, où s'accomplissent des divisions cellulaires, sont susceptibles d'infection; là seulement le virus se multiplie.

Parmi les tissus et les organes du tabac, seuls ceux qui à la fois sont en voie de croissance rapide, et le siège de divisions cellulaires, sont attaqués par le virus: tous les tissus adultes sont à l'abri de l'infection, mais capables de transporter le virus dans des conditions déterminées. Les feuilles qui croissent encore, mais n'ont plus que la période d'élongation des cellules à parcourir, ne se laissent plus infecter, bien qu'elles soient même alors parfaitement aptes à transporter le virus vers la tige.

Si l'on inocule la tige, ce sont les feuilles embryonnaires qui sont seules infectées, ainsi les feuilles nouvelles qui se développent aux dépens du point végétatif. Il en est de même quand on infecte les jeunes feuilles: le virus retourne des feuilles dans la tige, et va contaminer le bourgeon axillaire; ou bien il remonte pour attaquer le bourgeon terminal. Si l'on fait usage pour l'infection d'organes adultes, soit tige soit feuilles, on est certain de ne pas réussir, dès que l'on a pris peu de virus. Evidemment ce dernier est retenu par les cellules adultes, et est donc inactif. Mais quand on injecte une grande quantité de poison, celui-ci peut se répandre des parties adultes dans les néo-formations voisines, et les infecter.

Cependant, il me paraît établi que le virus ne saurait se multiplier et propager la contagion que s'il est contenu dans des tissus en voie de division cellulaire. Les tissus adultes, et même ceux qui sont encore en voie d'élongation de leurs cellules, constituent un milieu tout à fait défavorable. Le virus, sans pouvoir croître par lui-même, est entraîné dans la croissance des cellules en division, et s'y multiplie énormément, sans perdre en rien son individualité. On comprend ainsi qu'en dehors de la plante aucun pouvoir de multiplication ne puisse être observé. Je pus d'autre part conserver pendant plus de trois mois[1] du suc clair, ayant passé la bougie, et privé de toute bactérie, sans qu'il perdît sa virulence ou même la diminuât en apparence. Néanmoins je ne pus observer une augmentation quelconque des propriétés contagieuses, même au début de l'expérience; et cependant le suc était préparé non seulement par l'écrasement de parties malades, mais aussi en y ajoutant celui de jeunes bourgeons sains et de jeunes feuilles saines. Si donc le virus avait pu se multiplier par nutrition de la manière ordinaire, cette multiplication aurait très probablement eu lieu. D'ailleurs quand on ensemence un peu de virus en un point d'une gélatine de culture appropriée, la couleur et l'indice de réfraction de cette gélatine demeurent visiblement inaltérés en tous les points.

---

1) Quant à la durée de la conservation du suc exprimé, je ne saurais encore rien en dire; elle dépasse dans tous les cas trois mois.

Il est vrai qu'il est très difficile de juger de la quantité de virus employé [illegible] pour l'inoculation, et comme la question de la multiplication de ce virus est des plus importantes, il sera nécessaire d'instituer de nouvelles expériences. En attendant et comme je l'ai dit, je dois admettre que le virus n'est capable de multiplication que s'il est mélangé au protoplasma vivant et en voie de croissance de son hôte.

La manière dont le virus se comporte à l'égard des tissus en voie de croissance rappelle les phénomènes analogues dans la cécidiogenèse; en effet les substances cécidiogènes n'affectent que les cellules en voie de développement. Mais ces dernières substances se comportent au point de vue de leur déplacement d'une tout autre manière; elles doivent pour agir être introduites dans les tissus méristématiques et ne circulent que dans ces tissus; jamais elles ne se déplacent comme le virus, de parties adultes aux méristèmes éloignés.

Le mode de multiplication du virus rappelle à beaucoup de points de vue celui des amyloplastes et des chromoplastes, qui ne croissent également qu'avec le protoplasme cellulaire, mais mènent cependant une existence indépendante et fonctionnent isolément.

3. *Circulation du virus dans la plante. Divers modes d'infection; infection locale et générale.*

Dans l'infection artificielle le virus peut se déplacer avec le courant aqueux dans les faisceaux fibro-vasculaires. Je ne crois pas cependant que le xylème constitue le canal normal dans la plante non blessée. Si en effet on inocule de jeunes feuilles au moment où elles allongent leurs cellules, ou plus tard, à l'état adulte, ces feuilles, comme nous l'avons vu, demeurent complètement normales, tandis que le virus retourne à la tige pour aller infecter des néo-formations situées à un niveau supérieur. Or il me paraît qu'un pareil mouvement n'est possible qu'en empruntant la voie de ce qu'on nomme la sève descendante, c'est-à-dire le liber. L'existence d'un courant qui dans les conditions normales parcourrait les feuilles en suivant le bois ou le parenchyme tout en se dirigeant vers la tige, n'est pas très probable; on pourrait cependant l'admettre dans le xylème si la transpiration est forte.

Si le virus se meut réellement dans le liber, le sens du mouvement doit pouvoir être tout aussi bien ascendant que descendant et être soumis aux lois qui régissent la direction du mouvement des matières nutritives ordinaires, soit lors du dépôt comme matériaux de réserve (vers le bas), soit lors de la nutrition des néo-formations (vers le haut). Le courant doit donc, selon les circonstances, être dirigé tantôt vers le sommet, tantôt vers la base de l'organe. Les phénomènes d'infection sont parfaitement d'accord avec cette idée.

Le lent déplacement du virus le long du liber se traduit, à ce qu'il me semble, d'une manière assez curieuse dans la disposition relative des feuilles attaquées après une infection locale de la tige. Souvent (peut-être toujours) la feuille où sont apparus les premiers symptômes est située immédiatement au-dessus de la blessure résultant de l'inoculation. Dans le cas où le lieu de l'infection est extrêmement circonscrit, par exemple une simple piqûre peu profonde au moyen d'une seringue de Pravaz, la deuxième feuille attaquée peut être exactement [illegible] au-dessus de celle affectée en premier lieu. En ce moment, peut-être [illegible] y a une propagation, que l'on pourrait dire en spirale, du virus [illegible]

séries foliaires voisines, et finalement toutes les feuilles sur le pourtour de la tige, sont attaquées. Il est curieux que le point végétatif absorbe plus difficilement le virus que ses néo-formations; pour mieux dire il peut s'en débarrasser; en effet, il est établi que dans certaines conditions il peut s'y former plus tard des organes sains.

Ce qui me porte à croire que le virus peut aussi se propager le long des faisceaux ligneux et atteindre par cette voie les feuilles embryonnaires, c'est que beaucoup de mes plantes ont donné des feuilles extrêmement déformées à leur sommet, et dès le moment où elles se dégageaient du bourgeon, tandis qu'à cette époque les phénomènes généraux de la maladie ne s'observaient pas encore dans la portion inférieure des mêmes limbes. C'est comme si une grande quantité de virus s'était répandue instantanément dans la portion apicale de la néo-formation embryonnaire; or ceci ne paraît possible que grâce au courant d'évaporation, le long des faisceaux ligneux. Des feuilles pareilles présentent plus tard les phénomènes ordinaires de la maladie, mais alors on sera plus tenté de considérer le courant des matières plastiques comme charriant le virus.

Le virus est susceptible d'être emporté très-loin, en franchissant de longues distances dans les tiges et les racines. Cela se démontre par des expériences d'infection au moyen de la terre des pots où ont été cultivés des plants de tabac. Pour me rapprocher autant que possible des conditions naturelles, j'ai disposé les expériences d'une manière très simple, décrite aux § 6 et 7. Il suffira de mentionner ici que des plantes déjà hautes de deux décimètres et davantage, et dont les feuilles inférieures avaient déja péri depuis longtemps, furent facilement infectées par la racine, au moyen de terre renfermant le virus sec, et purent donc être ainsi rendues malades. De même que dans l'infection par piqûre, toutes les parties adultes, même celles qui sont encore en voie d'élongation, restent saines; seules les feuilles nouvelles formées aux dépens des bourgeons terminaux et axillaires présentent les symptômes de la maladie.

Le déplacement est lent dans ces conditions, et les symptômes se laissent parfois attendre au moins trois semaines à un mois à partir de l'inoculation. Mais cet intervalle dépend du développement de la plante, de telle sorte que des plantules récemment germées, dont on blesse les racines, montrent plus vite les attaques de la maladie. Mes expériences sur les plantules non blessées ne sont pas encore terminées, de sorte que je ne saurais encore indiquer par quelle voie le virus pénètre dans la plante complètement normale. Il est clair que cette question n'est pas sans importance au point de vue pratique, bien que les plants de tabac soient repiqués après la germination, ce qui produit infailliblement un grand nombre de blessures par l'arrachement des fibres radicellaires, autant de portes ouvertes au virus.

Pour se convaincre en très peu de temps de la virulence du contagium, on ne peut mieux faire que de blesser la jeune tige aussi près que possible du bourgeon terminal, sans endommager celui-ci, au moyen d'un petit scalpel, et d'introduire dans la blessure un fragment de tissu contaminé frais. Les feuilles développées à partir de ce moment présentent nettement au bout de dix à douze jours les premiers symptômes de la maladie, et au bout de trois semaines la nielle est évidente, même pour un oeil inexercé [1]).

---

[1]) J'ai pu récemment, en inoculant des portions encore bien plus jeunes des bourgeons, réduire à trois jours l'intervalle entre l'inoculation et l'apparition de la maladie.

Ce qui est remarquable, c'est la différence entre les plantes infectées par le sol et celles où le virus a pénétré par des blessures de la tige. Tandis que les premières présentent le tableau d'une infection générale dès le moment que les symptômes apparaissent, c'est-à-dire que les feuilles attaquées sont placés sur tout le pourtour de la tige, chez les dernières l'infection reste d'abord localissée sur une orthostique foliaire, et n'envahit que plus tard les séries voisines.

4. *Le virus se laisse sécher sans perdre ses propriétés infectieuses.*

Des fragments de feuilles malades desséchées, introduites dans des plantes saines, étaint encore capables de l'infecter même après avoir été conservées pendant deux ans dans mon herbier. De même des fragments de papier à filtrer, imbibés du suc exprimé de plantes contaminées, et prudemment séchés à 40° C. Des parcelles des feuilles suffisent à l'inoculation, et celle-ci peut donc s'opérer au moyen de quantités à peine appréciables du virus. Cependant la virulence des matériaux séchés est toujours inférieure à celle des matériaux frais, ce que j'attribue à ce que le virus est détruit partiellement lors de la dessiccation. Je ne crois pas qu'il se transforme en une modification moins active, car j'obtins avec peu de virus frais des phénomènes en apparence identiques à ceux provoqués par beaucoup de virus sec. Aussi me paraît-il encore douteux si l'on peut bien appliquer ici le mot »virulence«. J'introduisis le virus sec dans les tiges et les nervures médianes des jeunes feuilles, ce qui me conduisit aux résultats ordinaires.

Je ferai encore remarquer que le précipité, formé par l'alcool dans le suc exprimé, conserve sa virulence après dessiccation à 40° C. Mais l'alcool concentré est également inoffensif pour les spores de plusieurs espèces de bactéries.

5. *Le virus peut passer l'hiver dans le sol, hors de la plante et à l'état sec.*

En l'automme de 1897, je laissai périr par dessiccation une plante contaminée, placée sous un hangar dans un grand pot à fleurs. La plante fut arrachée, la terre adhérant aux racines, en secouant celles-ci, réintroduite dans le pot, et celui-ci avec son contenu conservé à sec. Le printemps suivant, je distribuai cette terre sur quatre pots partiellement remplis de terre fraiche. L'un de ces pots était plus grand que les autres et reçut trois plantes; dans chacun des trois pots plus petits fut placée respectivement une seule plante; toutes avaient plusieurs feuilles, dont les inférieures étaient déjà mortes. Toutes ces plantes étaient incontestablement tout à fait saines. Au bout de quatre semaines environ elles étaint dans l'état suivant. Des trois individus dans le grand pot, un était attaqué, les deux autres étaient sains et le restèrent jusqu'à la fin de l'expérience. Les individus dans les trois petits pots ont tous pris la contagion. L'un d'eux se développa mal dès l'abord, présenta les symptômes de la nielle à un degré très violent, et ne tarda pas à développer les feuilles monstrueuses particulières, si caractéristiques pour l'infection artificielle par blessure, dont les effets sont plus prononcés. La plante a développé aussi quelques feuilles tout à fait chlorotiques. Comme d'ailleurs les autres phénomènes typiques de la maladie étaient très prononcés chez cette plante, il est certain que le principe con-

tagieux peut conserver son entière virulence dans le sol sec, et après un hiver entier. Les autres plantes montrèrent le cours régulier de la maladie. Comme dans le cas de quelques-unes d'entre elles j'avais agité la terre dans les pots au moyen d'un morceau de bois, je soupçonne que la plante monstrueuse avait été fortement endommagée aux racines, ce qui avait ouvert des voies d'accès nombreuses au virus.

6. *Autres expériences d'infection par les racines.*

Le 6 juillet 1898, une série de plantes saines, cultivées en pot et ayant atteint plusieurs décimètres de haut, furent infectées de la manière suivante. Un individu fortement attaqué fut extrait du sol avec la motte de terre adhérente, puis la terre recueillie en secouant et répartie par petites portions sur la terre des individus en pots, tout près de la tige principale. J'arrosai alors au moyen de l'eau de la canalisation, et enfonçai la terre infectante, tout en évitant de blesser les racines. Au bout d'environ quatre semaines toutes les plantes en expérience présentèrent les symptômes de l'infection générale dans les feuilles nouvellement dépliées. Vers cette époque, je fus surpris de voir commencer une période d'amélioration, si bien que vers la fin d'août je considérais les plantes comme saines. Plus tard cependant les feuilles sont redevenues malades, quoique sous une forme assez bénigne.

Je crois devoir conclure de ces expériences, que les racines normales sont capables d'absorber à travers leur épiderme clos le virus présent dans le sol. J'admets cependant que cette conclusion n'est pas inévitable, car peut-être des animaux vivant sous la surface du sol ont-ils, en blessant les racines, rendu possible ou favorisé la pénétration du virus. Seules des expériences avec des plantes cultivées en solutions nutritives pourront-elles, à mon avis, trancher définitivement cette question.

7. *Le virus est paralysé à la température d'ébullition. Action de la formaline.*

J'ai longtemps songé à la possibilité qu'il y aurait en jeu, dans l'infection, un anaérobie quelconque. Ce fut surtout après que j'eus appris à connaître les propriétés d'un groupe de ces organismes, répandu dans l'engrais et les matières fécales, et que je nomme »bactéries du scatol« que je crus avoir des raisons pour une pareille hypothèse. La microaérophilie est chez ces formes de telle nature que l'on est forcé de conclure à une consommation d'oxygène relativement forte. De plus, beaucoup le variétés ont des spores si exceptionnellement petites, soit sphériques soit ellipsoïdales, que l'on ne saurait complètement nier la possibilité de leur passage à travers les pores des bougies. C'est pourquoi j'ai fait un certain nombre d'expériences au moyen de sucs bouillis, fraîchement exprimés ou filtrés sur bougie.

Ces expériences ont conduit à un résultat absolument négatif pour la présence de spores bactériennes. L'ébullition détruit complètement le virus. Même 90° C. ne sont pas supportés, la caléfaction à ce degré pendant une courte durée suffit déjà à le paralyser. Je n'ai pas d'ailleurs jusqu'ici déterminé le minimum de température, mais je ne doute pas qu'il ne peut être question ici que de simples températures de pasteurisation. En réalité, ces résultats suffisent déjà indépendamment de ce qui précède à écarter une fois pour toutes l'idée d'organismes anaérobies et de leurs spores.

C'est peut être ici le moment de dire un mot de la stérilisation des instruments servant aux expériences, surtout de la seringue de Pravaz. La modification apportée par M. Koch à cet instrument est sans le moindre doute favorable à la stérilisation, seulement la poire de caoutchouc ne permet pas d'injecter les liquides sous une pression aussi forte qu'avec la forme primitive. J'ai donc essayé de stériliser cette dernière, qui ne supporte pas bien l'application de la chaleur, au moyen de formaline. Mais ceci ne réussit qu'incomplètement, et seulement à condition de faire usage de grandes quantités du stérilisant. Des solutions faibles de formaline, mélangées au virus, ne détruisent pas celui-ci. Cependant le temps d'incubation est modifié, si bien que la maladie peut ne devenir manifeste que six semaines ou davantage après l'inoculation. Dans tous les cas on doit être certain avant de se servir de la seringue que les dernières traces de formaline sont complètement évaporées; car j'ai remarqué que la formaline est très vénéneuse pour les cellules du tabac, encore beaucoup plus que pour le virus lui-même. Je reviendrai encore là-dessus au § 9. Ici je relèverai simplement que la formaline, quand elle pénètre dans les vaisseaux du végétal, est transportée avec une rapidité remarquable dans les nervures foliaires, dont les cellules vivantes meurent bientôt. L'injection prudente de formaline dans le pétiole, de manière que les faisceaux ligneux ne soient pas mécaniquement endommagés, permet de détruire tous les tissus vivants pétiolaires, sans entraver en rien le courant de sève; de telle sorte que la feuille reste fraîche et peut continuer sa croissance.

8. *Diverses manifestations de la maladie. Production de feuilles monstrueuses par de grandes quantités de virus.*

A mon avis, la nielle des feuilles de tabac est, dans sa forme bénigne, une maladie des grains de chlorophylle; dans ses formes plus intenses c'est une affection générale du protoplasme vivant [1]). Voici le cours de la forme bénigne. Quand on inocule le virus en blessant les tiges au-dessous du bourgeon terminal, les feuilles qui se développent dans le courant des dix premiers jours restent saines. Les jeunes feuilles qui se développent plus tard présentent sur toute leur surface un aspect bariolé, sont parsemées de tâches jaunâtres, ce qui en soi n'est nullement caractéristique et se rencontre aussi fréquemment chez les feuilles saines. Au bout de quinze jours à trois semaines, on voit se dessiner un phénomène très remarquable (Pl. VI, fig. 1). Dans le voisinage des nervures secondaires de 2e ou de 3e ordre, la couleur verte se fonce beaucoup, suivant des champs rectangulaires, que les nervures partagent par le milieu. Dans le reste de la feuille, le verdissement procède avec un peu plus de lenteur que dans les circonstances normales; rarement la teinte verte disparait là jusqu'au complet albinisme. Dans tous les cas il apparaît des taches vert foncé sur fond vert pâle. La limite entre les deux teintes est tantôt très nette, tantôt peu accusée, les teintes passant graduellement l'une à l'autre. Comme les portions foncées croissent plus vite que les portions pâles, les premières ne tardent pas à faire une saillie plus ou moins prononcée sur la surface foliaire. Dans les cas aigus la face supérieure des feuilles présente donc des espèces de cloches fortement bombées. Plus tard (Pl. VI, fig. 2) on

[1]) Je dois provisoirement passer sous silence les faits anatomiques, attendu qu'ils ne me sont pas encore fort clairs.

voit le long du bord, ou même au centre des taches foncées, débuter une nécrobiose des cellules, d'où résulte bientôt la production des petites taches brun clair, mortes et sèches, que craignent tant les cultivateurs de tabac, parce que la feuille devient par là impropre à servir de couverture pour les cigares. Bien que la plupart des endroits morts prennent naissance de la manière ci-dessus décrite à côté des champs vert foncé ou dans ceux-ci, l'origine d'un grand nombre d'autres taches demeure incertaine; il semble clair qu'elles peuvent se développer aussi aux dépens des taches jaunes. Dans les champs de tabac, les phénomènes ne sont pas le plus souvent aussi prononcés que dans l'infection artificielle; les ampoules formées par les parties vert sombre notamment font entièrement défaut. En revanche, la mort et le desséchement des taches ne se produisirent pas chez beaucoup des plantes cultivées dans ma serre.

Quand on injecte du suc exprimé frais, ou qu'on inocule des fragments de tissu malade, les symptômes peuvent offrir un degré d'intensité encore plus élevé, que je n'ai pas encore pu observer dans les circonstances naturelles [1]). C'est un développement anormal des feuilles nouvelles (Pl. V *b, c, d*, Pl. VI, figs. 4 et 5). Ce phénomène est incontestablement en rapport avec la quantité de substance ayant servi à l'infection. On peut ainsi provoquer bien plus facilement des feuilles monstrueuses avec le suc exprimé frais qu'avec le suc filtré sur bougie, attendu qu'il faut injecter une plus grande quantité de celui-ci pour produire de même effet, circonstance à coup sûr remarquable pour un virus qui se multiplie par croissance.

Ce qui frappe tout d'abord dans les feuilles monstrueuses, c'est l'arrêt de l'accroissement dans le sens de la nervure médiane et des principales nervures latérales. Cela donne lieu à des limbes ovales ou circulaires. Plus tard, on observe les taches vert intense, qui se bombent en forme d'ampoule, et contrastent singulièrement avec les autres parties du limbe; ces dernières restent plus pâles et ont même, surtout le long des nervures, une tendance à l'albinisme. Une fois je vis se former, ou lieu de la monstruosité ci-dessus décrite, une petite ascidie bien développée. De pareilles feuilles complètement méconnaissables restent toujours beaucoup plus petites que les feuilles malades qui se forment plus tard; elles sont d'ailleurs toujours absolument saines et fraîches, ce qui explique que les symptômes de la maladie ne deviennent jamais fatals à la plante. Même des individus fortement attaqués forment des tiges de hauteur et d'épaisseur normales, et finalement, vers la fin de la période de végétation, souvent des feuilles complètement saines; ils fleurissent et fructifient normalement, et, autant qu'on est renseigné à cet égard, les graines en sont toujours normales. Réussira-t-on à infecter artificiellement des fleurs et des graines? C'est ce que je ne sais pas encore, attendu que j'ai commencé trop tard les expériences à ce sujet.

Chez les plantes cultivées en pleine terre, les phénomènes diffèrent tellement en intensité, que l'on songe involontairement à l'existence de prédispositions individuelles. Si cette impression ne trompe pas, et si réellement il s'agit d'autre chose que d'une différence dans les quantités initiales du virus, ce sera probablement chose facile d'engendrer une race douée d'immunité, l'infection artificielle devant naturellement servir de critérium. La facilité de pareilles expériences d'infection permet d'attendre un succès.

[1]) Probablement parce que des plantes fortement attaquées sont remarquées de bonne heure et arrachées. Aux Indes Néerlandaises ce sont surtout ces feuilles déformées que l'on craint dans les cultures.

9. Albinisme ou panachure résultant accidentellement d'une infection artificielle.

Beaucoup de mes individus d'expérience ont montré sur leurs feuilles des taches où la chlorophylle manquait complètement. Dans certains cas isolés, ces taches étaint répandues par centaines sur le limbe, et distribuées d'un manière si élégante, qu'il en résultait des plantes à feuilles panachées réellement décoratives (Pl. VI, fig. 3). Jusqu'ici cependant les conditions des phénomènes m'échappent; je ne sais s'il sera possible d'aborder expérimentalement la question avec un résultat quelque peu constant. Je citerai ici un ou deux cas où il semble que l'on puisse entrevoir une relation de cause à effet.

Albinisme à la suite d'une inoculation mixte: une bactérie et le virus. Le suc exprimé des feuilles malades, après avoir séjourné vingt-quatre heures à la température ordinaire, servit à ensemencer, pour isoler les bactéries qui s'y étaient développées, un milieu de culture de la composition suivante: décoction de 20 gr. de feuilles de trèfle dans 100 gr. d'eau, additionnée de 2 gr. de sucre de canne, de 10 % de gélatine, filtrée et bouillie.

Il s'y développa surtout deux espèces de bactéries dont l'une, faiblement ou non liquéfiante, non douée de pouvoir de fermentation, à laquelle j'ai donné le nom de *B. anglomerans*[1]), est extrêmement commune à la surface des plantes. Elle se rencontrait par millions dans chaque centimètre cubes de suc. Lors du premier ensemencement j'avais simplement versé le suc exprimé sur la plaque de gélatine, de telle sorte que chaque colonie bactérienne, à ce qu'on peut admettre, était infectée du virus. Je transportai alors, sans isolation ultérieure, ces colonies sur le milieu dont la composition est donnée ci-dessus, renfermé dans des éprouvettes. Une trace virus pouvait donc avoir été transportée en même temps, mais en quantité extrêmement faible si dans les colonies bactériennes mêmes le virus ne se multipliait pas. Comme la bactérie se développe rapidement il se forma en peu de temps une grande quantité de substance, que je suspendis dans l'eau de la canalisation, et au moyen de laquelle j'infectai le 30 septembre un plant de tabac, injectant une forte quantité de matière. Je croyais au début que le plant resterait complètement sain; cependant le 15 octobre j'observai les premiers symptômes, qui toutefois ne se développèrent pas davantage; il en résulta une plante panachée magnifique.

La deuxième forme bactérienne, traitée absolument de la même manière que la précédente, demeura complètement sans effet quand je m'en servis pour une inoculation.

Comme j'ai conservé les cultures, je pourrai répéter l'expérience. La question qui me semble le plus importante, c'est de savoir si le virus ne se trouve que comme simple impureté dans les colonies, ou bien s'il s'y est multiplié, soit entre les bactéries soit dans le corps de celles-ci. Dans ce dernier cas on pourrait se demander s'il y a eu peut-être modification des propriétés du virus.

Albinisme par inoculation d'un virus mélangé de formaline. L'observation que je vais mentionner a été complètement fortuite. Ayant nettoyé ma seringue de Pravaz avant de m'en servir, avec de la formaline, il en resta un jour une certaine quantité

---

[1]) *Botan. Zeit.* 1888, p. 740.

dans le canal de l'aiguille. Le liquide pénetra avec le virus dans la plante en expérience, ce que je reconnus immédiatement à la mort des cellules avoisinant la blessure. Plus tard, la plante ne montra qu'indistinctement les symptômes de l'affection; mais plusieurs feuilles se panachèrent dans la suite [1]).

Albinisme à la suite d'une infection provenant du sol. Quelques plants contaminés très tard dans la saison, en serre, par infection de la terre des pots où elles croissaient, au moyen de terre chargée de virus, méritaient plutôt d'être appelées panachées qu'atteintes de la mosaïque. Les taches vert foncé le long des nervures étaint à peine visibles, tandis que la décoloration s'etait fait sentir dans le reste du parenchyme d'une manière particulièrement rapide et intense. Cependant les taches des feuilles panachées ne sont devenues blanches qu'en partie, la majorité restant jaunâtre. Chez une de ces plantes les feuilles inférieures sont restées très petites, et ont affecté la forme anormale décrite antérieurement.

Des trois cas de panachure que j'ai décrits dans ce §, les deux premiers semblent avoir ceci d'analogue, que le virus pénétra dans la plante à un état de forte dilution. Je ne crois pas cependant que la dilution soit ici un facteur essentiel, car le troisième cas semblait plutôt faire songer à l'action d'une quantité particulièrement grande de virus. Mais quoiqu'il en soit, je crois fort probable, sinon démontré, qu'il y a un rapport quelconque entre le virus de la maladie et la panachure. La vieille question si la panachure a toujours la même origine est donc de nouveau, par les observations ci-dessus rapportées, remise à l'ordre du jour.

10. *Autres maladies infectieuses des plantes, provoquées par un principe contagieux fluide, et non par des parasites.*

S'il est vrai que les phénomènes de la nielle ont tellement d'analogie avec certaines formes de l'albinisme ou de la panachure que les deux classes de maladies peuvent être sans hésiter rangées dans les maladies chlorophylliennes, il y a cepedant, à ce que m'ont appris jusqu'ici mes observations et l'étude de la littérature, une différence essentielle dans le mode de transport du virus d'un organisme à l'autre. Il faudra donc en faire deux maladies distinctes, ayant chacune leur virus particulier. En effet, la forme d'albinisme qui, d'après les auteurs, se laisse inoculer, n'est transplantée sur un autre individu que s'il y a union intime entre les tissus vivants, albinotiques et les tissus vivants verts, à la suite d'une greffe. Au contraire, la simple inoculation de la plante verte avec les tissus écrasés ou le suc exprimé des variétés albinotiques de la même espèce, reste sans aucun résultat, à ce que m'ont appris mes propres recherches souvent répétées sur *Ulmus campestris, Acer Negundo, Pelargonium zonale* et *Urtica dioica* [2]). Il semblerait donc que si le contagium de l'albi-

[1]) J'ai répété cette expérience, mais n'observai que les symptômes ordinaires de la nielle, quoique tardifs. Si le virus reste longtemps en contact avec la formaline, même très diluée, il est complètement détruit.

[2]) L'an dernier, j'ai fait plusieurs expériences relatives à la transmission de l'albinisme du *Pelargonium zonale* sur les individus verts *par la greffe*, mais je n'ai pas eu le moindre succès. Quoique j'aie trop de confiance dans ce qu'ont rapporté les auteurs pour douter de la possibilité de cette transmission, je dois ajouter que déjà il y en a d'autres qui ont mis en doute le caractère contagieux de l'albinisme, et exprimé l'opinion

nisme est en réalité capable de se déplacer, il reste en relation beaucoup plus intime avec le protoplasme de la plante que le contagium de la nielle. Il ne peut probablement pas exister en dehors de l'individu comme ce dernier, et est détruit quand les cellules végétales qui le renferment ou le transportent meurent elles-mêmes. Cependant mes observations précédentes montrent suffisamment que le dernier mot à ce sujet n'a pas encore été dit. Comme la question de la contagiosité de l'albinisme est très importante, tant pour la théorie du développement que pour celle de la variabilité, des expériences nouvelles sont fort à désirer.

Une autre maladie qu'il faut certainement ranger ici, c'est celle connue en Amérique sous le nom de »Peach Yellows«[1]). Les symptômes de cette maladie consistent surtout en une maturation hâtive des fruits, l'éclosion des bourgeons dormants à des époques extraordinaires avec formation de broussins, souvent étiolés, et le jaunissement des feuilles, suivi au bout de quelques années de la mort de l'arbre entier. Des bactéries ou d'autres parasites ne sont pas à coup sûr, suivant M. Smith, le cause de cette maladie. Néanmoins il fut facile de communiquer la maladie à des arbres sains, rien qu'en greffant dessus un bourgeon d'un arbre malade. Il se montra à cette occasion qu'il faut pour que la contagion s'opère que le bourgeon se fixe, car sans soudure des tissus vivants le virus, d'après M. Smith, n'est pas capable d'infecter des arbres sains. M. Smith ne manque pas de faire ressortir l'analogie qu'offre ce mode de transport avec celui de l'albinisme chez *Abutilon* et *Jasminum*.

»Peach Rosette« est d'après M. Smith une autre maladie non-parasitaire, intimement alliée au »Peach Yellows«, facilement transmissible par greffe soit par écusson soit par bouture sur racine. La maladie se révèle par ce que tous les bourgeons, tant dormants qu'actifs, donnent de petites rosettes, formées de quelques grandes et plusieurs centaines de petites feuilles. Les feuilles ont une teinte jaune, mais tombent bientôt desséchées sur le sol. Ici encore s'observe la particularité, que j'ai également mentionnée à propos de la nielle, que le virus ne se déplace que difficilement dans le sens latéral, mais facilement vers le haut. Un arbre peut en conséquence devenir malade à l'endroit où s'est développée la rosette, tandis que le côté opposé peut encore rester sain des années durant[2]).

M. Smith pense que le caractère épidémique, aussi bien du »Yellows« que de la »Rosette« nous force à admettre l'existence d'un autre mode de contagion, outre celui

---

que les individus verts devenus panachés après greffe d'individus panachés, le seraient devenus également bien sans cette greffe, par simple variation spontanée des bourgeons. Ils font valoir que les souches employées (*Abutilon, Jasminum, Pelargonium*) sont des plantes des jardins, dont les individus verts ont une forte tendance à l'albinisme. Pourtant de pareilles objections ne sont pas suffisamment fondées (voir p. ex. Lindemuth, Vegetative Bastarderzeugung durch Impfung, *Landwirthsch. Jahrb.* 1878, Heft 6, et Vöchting, Transplantation, pp. 13, 22, 92 et 112. Tübingen 1892).

[1]) Erwin F. Smith, Peach Yellows and Peach Rosette, *U. S. Department of Agriculture, Farmers Bulletin* N°. 17. Washington 1894. — Je ne connais cette courte mais intéressante notice que par le tiré à part que l'auteur a eu l'obligeance de m'envoyer. A ma grande surprise je n'en ai trouvé nulle mention chez les auteurs que j'avais à ma disposition.

[2]) Cette dernière observation semble exclure complètement la possibilité qu'il s'agisse chez le »Peach Rosette« d'une invasion de Phytoptus, malgré que les autres symptômes de la maladie y fassent songer.

par soudure des tissus. Il ne croit pas cependant que le virus puisse provenir du sol, mais il fait remarquer qu'un arbre, surtout chez la »Rosette«, peut être envahi presque simultanément dans toutes ses parties, ce qui, comme nous l'avons vu ci-dessus, ne peut guère s'accorder avec une infection locale. On doit songer plutôt à une infection générale, comme dans la nielle du tabac, quand les plantes sont infectées par le sol.

Comme M. Smith n'a pas fait d'expériences avec du suc artificiellement injecté, il reste possible, ou même probable, que ces expériences pourraient donner un résultat positif. S'il en était réellement ainsi, le virus serait capable d'exister aussi en dehors de la plante, une infection provenant du sol ne serait pas exclue, et le »Yellows« et la »Rosette« seraient bien plus étroitement alliées à la nielle que la description ci-dessus ne tend à faire admettre.

Je crois extrêmement probable que bien d'autres maladies des plantes, dont l'origine est inconnue, mais qui ne sont pas parasitaires, devront être attribuées à un contagium fluide. Il me paraît dans l'intérêt des recherches futures dans cette direction de distinguer nettement entre les deux formes sous lesquelles, à ce que nous savons jusqu'ici, un pareil contagium peut se renvontrer. C'est d'abord celle d'un virus ayant une existence propre, bien que ne pouvant exister que temporairement hors de la plante, tel que celui de la nielle du tabac, — en second lieu comme un contagium exclusivement lié aux tissus vivants, comme dans la forme de l'albinisme qui se laisse communiquer par greffe, mais aussi seulement par cette voie.

Postscriptum.

Depuis la publication du précédent mémoire, M. Iwanowsky a montré [1]) que la priorité de l'expérience avec le liquide filtré sur porcelaine lui appartient, et non pas à moi. Je me fais un plaisir de constater l'exactitude de sa remarque. A l'époque où je préparais la publication de mon travail, je ne connaissais encore ni les recherches de M. Iwanowsky [2]) ni celles de M. Poloftzoff.

Quant à la prétendue différence entre la »mosaïque« ou »nielle« et la maladie des »taches brunes« (»Mosaikkrankheit« et »Pockenkrankheit« comme M. Iwanowsky les appelle), voici quelques observations que je désire faire:

Je persiste à croire en contradiction directe avec M. Iwanowsky que les taches brunes et mortes marquent fréquemment, sinon toujours, la fin de la mosaïque ou nielle et je ne reconnais pas une »maladie des taches brunes« particulière (»Pockenkrankheit«). Je puis confirmer que l'évaporation en favorise l'apparition, de même que des taches de cette apparence peuvent prendre naissance indépendamment de la nielle. Je puis établir ceci par des expériences personnelles. En effet, dès l'époque où j'étais encore sous l'impression que des bactéries ou leurs produits de sécrétion provoquaient la nielle, je me mis déjà à injecter les plantes au moyen de toute sorte de combinaisons chimiques. L'idée que la maladie était en premier lieu une affection chlorophyllienne m'amena à expérimenter avec des substances qui fixent les sels de fer. Je m'aperçus à cette occasion que le ferrocyanure de potassium est particulière-

[1]) *Centralblatt für Bacteriologie*, 2e Abth., Bd. 5, p. 250, April 1899.

[2]) L'expérience en question est décrite dans les *Mélanges biologiques*, Tome 13, p. 237, 1894, et *Bulletin de l'Académie impériale des sciences de St. Pétersbourg*, T. 35, p. 67, 1894.

ment propre à provoquer la formation d'ilôts bruns de tissu mort, semblables à ceux que j'avais si souvent observés vers la fin de la nielle; seulement ils sont plus étendus ordinairement. Le tannin peut avoir le même effet, mais il faut une solution très concentrée, p. ex. de 5%. La même substance provoque en outre des malformations des feuilles, ressemblant à celles de la nielle en ce qu'on observe également un arrêt du développement des nervures. On sait que les parties blanches des feuilles panachées montrent de même assez fréquemment une mort prématurée des tissus, surtout quand l'évaporation est active, et ce serait chose facile de citer encore d'autres exemples de pareils phénomènes, qui à mon avis ne caractérisent pas du tout une maladie végétale spécifique. Aussi les taches mortes ne constituent-elles certainement pas le caractère principal de la nielle et peuvent-elles complètement faire défaut. Mais c'est, comme M. Iwanowsky le signale lui-même, ce que j'ai dit déjà dans mon travail.

Mon expérience avec l'agar ne paraît pas irréprochable à M. Iwanowsky. Comme il ne dit pas pourquoi, je ferai moi-même une objection. Plusieurs microbes pénètrent assez profondément dans l'agar et peuvent ouvrir ainsi la voie au virus, qui pourrait atteindre par là les couches profondes sans diffusion proprement dite. Comme je prévoyais la possibilité d'un cas pareil, j'expérimentai de manière à exclure cette source d'erreurs, en faisant usage du suc stérilisé de plantes malades. J'obtins ce suc de deux manières: 1. filtré sur bougie, 2. aux dépens de plantes malades, cultivées en milieu stérile. De pareils individus stériles s'obtiennent aisément en les laissant se développer sous une cloche de verre. Même la surface des feuilles, sur laquelle on trouve d'ordinaire un grand nombre de bactéries du sol, reste alors complètement stérile attendu que les jeunes feuilles sortent stériles du point végétatif, et ne sont plus infectées par la suite. L'agar, privé de germes, des couches profondes se montra pourtant propre à communiquer la contagion, si bien que je dois considerer la diffusibilité du virus comme établie.

Je ferai encore remarquer que, ni l'excitation provenant de la blessure, ni des injections d'eau de canalisatoin, ou de suc des plantes malades, ou, enfin, de solutions de nicotine, ne provoquent la maladie.

Comme les autres observations de M. Iwanowsky ne font que confirmer et étendre les miennes propres, sans approfondir la question, il ne me semble pas nécessaire de prolonger maintenant la discussion, qui est certainement encore loin d'être terminée.

Explication des figures.

Pl. V.

Jeune plant de tabac contaminé par infection artificielle au moyen d'une grande quantité de virus. Celui-ci avait été introduit dans une blessure en *a*, traversant toute l'épaisseur de la tige. Les premières feuilles malades développées dans la suite, *b*, *c*, *d*, ont pris une forme anormale, les feuilles suivantes *e*, *f*, sont malades, mais non monstrueuses.

Pl. VI.

Fig. 1. Jeune feuille de tabac au premier stade de la maladie, infectée par une quantité modérée de virus. On voit le long des nervures les taches vert foncé. Les modifications locales de la teinte chlorophyllienne n'ont d'ailleurs pas produit de contrastes nets sur la plaque photographique.

Fig. 2. Feuille de tabac au stade principal de la maladie. Les taches mortes et brunes se comptent par centaines.

Fig. 3. Feuille d'une plante devenue panachée à la suite d'une infection mixte de virus et du *Bacillus anglomerans*.

Figs. 4 et 5. Petites feuilles monstrueuses de tabac, ayant pris naissance en suite de l'introduction de grandes quantités de virus dans la tige.


c
d
b
f
e
a


FIG. 5
FIG. 4.
FIG. 3.
FIG. 2
FIG. 1.

On the relation of the obligatous anaërobics to free oxygen.

Proceedings of the Section of Sciences, Kon. Akademie van Wetenschappen, Amsterdam, Vol. I, 1898, p. 14—26. — Verscheen onder den titel »Over zuurstofbehoefte bij obligaatanaëroben« in Verslagen Kon. Akademie van Wetenschappen, Wis-en Natuurk. Afd., Amsterdam, Deel VII, 1898, blz. 19—32, en onder den titel »Les organismes anaérobies obligatoires ont-ils besoin d'oxygène libre?« in Archives Néerlandaises des Sciences Exactes et Naturelles, Haarlem, Série II, Tome II, 1899, p. 397—411.

The relation of the living cell to free oxygen is best to be judged from the influence of this gas on the *growth* and on the *mobility*. Of course, only the first method is of universal application.

As to the mobile microbes, some time ago I gave the name of »figures of respiration« [1]) to the peculiar groupings, which originate in preparations destined for the microscope, in consequence of the access of oxygen only along the edge of the examined drop under the cover-glass, the microbes being thereby enabled to seek that quantity of oxygen which is best adapted to their respiration. Three types may here be distinguished according as the microbes seek the highest tension of the oxygen along the edge, a middle tension at some distance of it, or the smallest tension in the centre of the preparation. These types I called the aërobic, the spirillous and the anaërobic type.

Further experience has shown that the anaërobic type, characterised by the accumulation of the moving microbes at that spot of the preparation where the oxygen tension is minimum, — commonly near the centre, — does not exist as a special type, but becomes visible only under particular circumstances, and further, that when the aëration of the preparation is sufficiently small, all anaërobics, examined till now, appear to belong to the spirillous type, that is to say, they not only don't fly those places in the preparation, where a small oxygen tension still exists, but they even seek them.

This tension, beneficient for the anaërobics is however very slight, whence follows, that by using only a moderate number of microbes, consuming but very little oxygen, there may enter at the edge more oxygen than is wanted. In such a case the tension, most approaching the required optimum, will be found in the centre. The accumulation of the microbes will then also be localised to the centre, causing the semblance of an anaërobic type as a special case. It is clear, that if this is the right explication, the true representatives of the second type, viz. the spirilli, must under cer-

[1]) Centralblatt für Bacteriologie, Bd. 14, pag. 837, 1893.

tain conditions also accumulate at the centre, namely then, when all the spirilli together cannot absorb the total quantity of oxygen entering along the edge of the preparation, and this is indeed easily to be observed, by using a small number of spirilli and a large coverglass.

So, there is no sufficient reason to divide the mobile bacteria into three types according to their relation to free oxygen, as I formerly did, but only into two. It also seems to me that the names for the types, already mentioned, are not quite applicable, and that it is preferable to call *aërophilous* all organisms which seek the highest oxygen tension [1]), and *microaërophilous* those which require a lower tension. To this latter group then, belong the obligatous anaërobics as far as now observed, and the aërobic spirilli with regard to their mobility.

I am obliged here to speak of »aërobic spirilli«, as I have formerly shown that there also exists an obligatous anaërobic spiril, namely the organism of the reduction of sulphates, *Spirillum desulfuricans*. Though this kind is very mobile, yet the growth is so slow, that I have not succeeded in collecting a sufficient number of individuals to get distinct figures of respiration, — a difficulty which exists also more or less with other obligatous anaërobics.

The conviction that free oxygen is beneficial to all that lives, and in the long run probably even necessary, is based on the relation of the *growth* of the obligatous anaërobics to this gas, and here the mobile forms as well as those which are not mobile may enter into consideration. Before however describing the experiments which seem decisive, I must fix the attention on the following circumstance.

For alcohol yeast and the other facultative anaërobics, it must be admitted, that the possibility of their temporary anaërobiosis, is determined by the presence of a *provision of oxygen* in loose combination with the living matter of the cell itself, by which combination some cell divisions are rendered possible without the supply of new oxygen. Consequently there must be a difference between aërated and not aërated cells.

If it is accepted that this relation holds also good for the obligatous anaërobics, then it is to be expected that their provision of oxygen will be much smaller than that in the yeastcell, so that it is necessary to take much more efficacious measures to render the influence of the oxygen visible in the former than in the latter case. It is therefore desirable, in some cases even necessary, to use for the experiments materials, taken from such cultures as have long been continued in absence of air, by which the provision of oxygen has been lessened. So far as I am now able to judge, strongly aërated anaërobics are, as to their growth, aërophobic, i. e. they grow best there where the oxygen tension is minimum or zero. As contact with air is in itself not sufficient to cause aëration, — spores for instance seem less fit to be aërated than vegetative cells, — there now and then occur strange incidents which make the experiments troublesome.

The way in which I arranged my growth experiments is as follows.

Material of the species to be examined, is introduced, in a not aërated condition, and if possible, in the state of spores, into the culture mass still in fusion, in such a quantity, that the germs, developped into colonies, may render that culture mass, after solidification, rather opaque.

---

[1]) Here is only question of experiments in common air, not in pure oxygen.

If such a culture mass, from which the free oxygen is completely withdrawn, is contained in a deep experiment-tube, where the air can only find access from above, then, if the growth is favoured by a certain oxygen tension, there must result at the very place where this tension becomes optimum, an opaque and distinctly visible *niveau* of colonies, which are greater than the colonies beneath and above this niveau.

The easiest way for completely removing the oxygen, is to sow simultaneously an aërophilous species, not acting injuriously on the development nor disturbing the observation of the anaërobic. Such an aërobic must have the following qualities: The oxygen must be completely absorbed, without exciting so much growth in the surface of the culture mass, that the colonies of the anaërobic become indistinct. Besides, an easy recognition in the microscopic preparation, and a simple separation of the aërobic and the anaërobic must be possible.

In trying various species of microbes, I found some kinds of yeast to be most efficient for the research of the anaërobics of putrefaction and of sulphate reduction, as for these processes no carbohydrates are essential, in which case yeast does not grow strongly, whilst it is distinctly recognisable under the microscope. Besides, yeast can easily be separated from the anaërobics of proteine putrefaction, because it dies at 50° à 60° C., whilst the spores of the latter can be heated to 90° à 100° C. without dying. For the examination of those anaërobics which require sugar in their food, as for instance the butyric ferments, it is preferable, for oxygen absorption, to make use of certain blastomycetes (which grow and reproduce like yeast, whilst alkohol fermentation is absent) or aërobic bacteria, which don't produce acid, nor liquefy gelatine. Good results were obtained with a red blastomycete, isolated from garden-soil, and with *Bacillus fluorescens non liquefaciens.*

It is good (but not always necessary), to place the prepared experiment-tubes, in an exsiccator which is vacuated. For this vacuation a Körting-waterjetpump with manometer will suffice, by which at the same time the pression of the gas used may be measured.

Another very suitable method to state the influence of oxygen on the growth, is to cultivate in the »humid room« on the objectbearer under the cover-glass, in a not too small quantity of the nutritious liquid, but in such a way as to keep the preparation thin enough for the microscope. In this way it is possible to observe, in the same preparation, first the figure of respiration and afterwards the growth.

The species of obligatous anaërobics which I have examined are the following.

Butyricferment (Granulobacter saccharobutyricum). This anaërobic is extremely common in garden-soil. Fit material for figures of respiration is to be obtained as follows. Water with some kalium phosphate and magnesium sulphate and 5 or 10 pCt. glucose is boiled in a little flask with so much fibrine that a thick paste is formed. During the boiling an infection with garden-soil is practised, in which only spores of bacteria remain alive. In the thermostate a vegetation of aërobics develops first, which, by the absorption of the oxygen, introduces butyric fermentation. Sometimes this fermentation will follow, even in absence of aërobics, i. e. notwithstandig the entrance of air into the mass of fibrine, thus showing that some aëration is certainly no bar to this process. If perhaps an aërobic grows too strongly, reinfection in another flask with the same mixture, will suffice to make it disappear and at length still to obtain an almost pure butyric fermentation. If in the infection material there are too

few spores, as well of the butyric ferment as of aërobics, some aërobic bactery, or a blastomycete must be purposely added for the absorption of the oxygen.

In this way a culture is obtained containing only the »oxygenform« of butyric ferment, i. e. only mobile staves and no clostridia. With them a figure of respiration may be produced consisting of a single fine line of quickly moving little staves, situated at some distance from the edge of the cover-glass and the meniscus of the preparation, which places the microaërophily of this ferment beyond all doubt.

If to the fermenting mass pure calcium carbonate is added, by which the acid is neutralised, the growth of the bacteria becomes much stronger, and the staves give place to clostridia rich in granulose, and which at length produce spores. Although the opaqueness caused by the chalk, spoils in some degree the purity of the figures of respiration, yet the experiment succeeds well enough, and leads to the same result, i. e. proves that the clostridia of the butyric ferment are microaërophilous in the same way as the oxygenform. With boiled milk [1]), in which a spontaneous butyric fermentation had originated, the above observations could equally be made. That the same may be said with regard to the *butylic ferment (Granulobacter butylicum)* formerly described by me [2]), I need hardly add here, as it was the continued study of this very ferment, which rendered the here described relations clearer to me.

Anaërobics of putrefaction of proteids. The most striking instances of obligatous anaërobics are met with in the putrefaction of pepton, or, generally speaking, of proteine substances. If one wishes to isolate the microbes concerned, efficacious measures must be taken for the exclusion of oxygen, as the quantity of air which these ferments admit, without their growth being impaired, is certainly much smaller than with the butyric and butylic ferments. Hence here in particular it was of importance to study their relation to oxygen.

Before entering upon my immediate subject, I think it necessary to say something about the different species concerned in the process of putrefaction, the literature on this subject being quite unsatisfactory.

Bacillus putrificus coli Bienstock [3]) is an anaërobic, found back by nobody, so that it cannot be typical for the putrefaction of proteids. Besides, an exact microscopic examination shows that more than one species must here be active. That however, the number of typical bacteria should be very great, I think doubtful, for the following reasons: The course of the process of putrefaction is quite the same when the material, after infection with soil, is for some moments heated to 90 à 100° C. as when this is not done. Hence it follows that only spore-forming microbes are typical for the process. The experiment shows further that exclusion of air acts favorably on its course, so that all aërobic microbes appear to be indifferent, except in so far as by absorption of oxygen, they favor the development of the properly so-called putrefaction bacteria.

By these two data the process was so much simplified from a bacteriological point

[1]) Milk, boiled in a not too undeep flask, will sometimes get into butyric fermentation, even with free entrance of air, without the presence of aërobics.

[2]) Archives Néerlandaises, T. 20, pg. 1. As this ferment produces much more propylicalkohol than butylicalkohol it would have been better to call it *Granulobacter propylicum.*

[3]) Zeitschrift für klinische Medicin, Bd. 8, pag. 1, 1884.

of view, that there appeared some chance of further unravelling it. Though hitherto I have by no means entirely succeeded, I think, nevertheless, that what follows holds good.

Three species of obligatous anaërobics are in particular concerned with the putrefaction of proteids. In the first place *Bacillus septicus,* secondly a group of extremely variable forms, related to the tetanusbacillus, and to which I will give the name of »skatol-bacteria«, and thirdly, an immobile, well-characterised species, called by me *B. pseudopulcher.* For separating these different species, I used a culture gelatine of the following composition: Destilled water, 10pCt. gelatine, 3 pCt. pepton siccum, 0,05 pCt. dinatrium phosphate, 0,05 pCt. magnesium sulphate, using at the same time yeast or a blastomycete for withdrawing the oxygen. When put into a deep experiment-tube, the anaërobics develop even with free entrance of air.

B. septicus Pasteur, is, according to my experience, one of the most spread species of bacteria, to be found wherever animal substances are tainting, and very common in dust and in the soil. It is an easily recognisable and well defined species. A virulent form of it goes in the German literature by the name of *B. oedematis maligni* [1]). Material of the latter, occuring in the laboratoria, I compared, also with a view to their relation to oxygen, with cultures of *B. septicus,* repeatedly isolated by me from putrefying albumen solutions, or fibrine, infected with garden-soil, but I could discover no difference.

The skatol-bacteria are to be known by the globular spores which are found in proteine putrefactions, in the swollen ends of thin, commonly long staves. One of the forms isolated retained at first, even in the pure cultures, globular spores, whilst in other isolations the spore-form proved not to be constant. The dimensions of spores and staves are most variable. Motion, if present, is slow, in pure cultures sometimes absent. Glucose, added to the above mixture, gives rise to the production of gas. The colonies cause the culture gelatine more to weaken than to liquefy; they are sometimes colorless, commonly, however, surrounded with a brownish aureole. The study of this species is difficult on account of the great variability in form and functions, which renders the experiments doubtful and often suggests infection with allied forms to which their common occurrence gives particular cause.

While skatolbacteria never fail in putrefying substances, *B. septicus* may be absent and its place be taken by *B. pseudopulcher.* This name was chosen on account of its resemblance to a common earthbactery, related to *B. megatherium,* and which I baptised *B. pulcher* [2]). Motion is never observed in *pseudopulcher;* the spores are oblong, larger than in *B. septicus,* frequently to be found in long rows within the threads, generally, however, they occur in short staves. The colonies, which liquefy strongly, have a smooth surface, by which they may be easily distinguished from *B. septicus.* They are characterised by a heavy sediment, consisting of staves and spores. This sediment is different, or wanting in *B. septicus.* The pure cultures develop gases but not many stinking products. There is often a distinct smell of cheese

---

[1]) A bactery, accepted by the medical men as a particular species, *B. Chauveaui* (of the French) or *B. emphysematos* (of the Germans) is, in my opinion, only a variety of it.

[2]) At present in trade by the name of »alinit«.

to be observed. The study of this bactery is still imperfect and I mention it only because it might be taken for *B. septicus*.

For the object I have in view, I studied in particular *B. septicus*, while I think, that there is not one indication in bacteriological literature which suggests any benificient effect of free oxygen on the functions of this bacillus. For the skatolbacteria on the other hand, such indications exist. It seems at least according to some authors, that certain varieties of the nearly allied and commonly obligatous anaërobic tetanus-bacillus, are suscept to change into aërobics, a transformation which I witnessed myself by other varieties isolated from putrefying albumen. Moreover *B. septicus* is a »bona species«, i. e. recognisable for everybody.

B. septicus is exceedingly mobile and generally consists of staves, covered all over with ciliae. Spores grow easily, especially when there is contact with air. They are more oblong than globular, mostly enclosed in the somewhat swollen ends of the staves, and surrounded by a hollow space. Though this bacillus is evidently polarically constructed, it moves spore-end or tail-end forward, and may suddenly change the direction of the movement. When a little air accedes, the staves may grow out into long threads and the motion ceases.

With a total withdrawal of oxygen there is a dispositon for the formation of clostridia, but without a marked difference between an »oxygenform« and a »clostridiumform« as found in *Granulobacter butylicum*.

If the nutrient matter is merely albumen or pepton, gases are produced, whose quantity increases more or less by the addition of glucose.

Fibrine and proteids produce volatile sulphides, sometimes in great profusion; production of merkaptan, too, is observed under unknown circumstances. The colonies liquefy the gelatine of the above composition; their surface is quite characteristically pointed, evidently because many small shoots pierce slightly into the gelatine, before the melting sets in. This may be compared with the behaviour of anthrax, where, however, there is no melting at all. Commonly whether spores or vegetative cells are sown out, only few germs develop, which proves, that the nutrient matter itself, — even the best I could procure, — acts in an high degree as a »bactericid« in relation to *B. septicus*. The growth is slow, even at brooding temperature, when compared to allied aërobics.

Concerning the necessity of oxygen for *B. septicus* and the skatolbactery, I could state what follows.

B. septicus I observed as well with regard to the figures of respiration, as to the growth. In both ways the microaërophily could with certainty be stated. As this bacillus is extremely mobile, and as the spores render the swarms of bacteria very opaque, the study of the figures of respiration offers no difficulty.

A small number of bacteria accummulating in the centre of the preparation, produce the impression of aërophoby. If on the contrary, the bacteria are very numerous, a circular accumulation is formed at some distance from the edge of the cover-glass and the meniskus, pointing out the place where the tension of oxygen is optimum. If we examine the inner field, i. e. the part surrounded by the accumulation and totally deprived of oxygen, there, too, all is in motion. This motion is however much slower, more staggering and uncertain, than in the accumulation itself. I think that this inner part is continually supplied with individuals from the accumulation, which

individuals, after some time return to the latter, to take in a new provision of oxygen. Outside the accumulation, near the edge of the cover-glass, where the pression of oxygen increases, the number of bacteria diminishes quickly, together with the mobility of the remaining ones. At the edge itself all is in complete rest, and no motion sets in when the surrounding is freed from oxygen. Still I have no reason to consider the resting individuals as dead; I even think they function as an »oxygen filtrum«, thus protecting the more inwardly swarming.

If some grains of fibrine are introduced into preparations of which the figures of respiration are being studied, and if placed at c. a. 25° C. in a »humid room«, a considerable increase of bacteria may readily occur. Watching the process micros- and macroscopically, we find the growth almost exclusively limited to the accumulation parallel to the edge, which accumulation grows more and more dense by the increase of the spores, whilst the central part continues as clear as at first. Consequently, it may be taken for granted that *B. septicus* requires oxygen for its growth, as well as for its mobility.

On this occasion I wish to correct a mistake in my description of *Spirillum desulfuricans*. I there stated erroneously [1]) that *Spirillum tenue*, which is typical for microaërophily as to mobility, is also microaërophilous with regard to growth, so that, when sown in a fit culture mass, it shows its maximum growth, not at the surface, but at a certain distance below it.

This has proved to repose on »trophotropy«, signifying that growth is more favored by the influence of the food than by the oxygen. It occurs only when a bad culture ground is taken for the experiment, and it is by the aërophily of the growing spirilli that it must be explained. For the intense growth will cause at the surface a rapid exhaustion, so that, if no abundance of food is present, and if the food can only come up slowly from the depth by the process of diffusion to the place of consumption, then, not the surface itself, but a deeper layer will, under the joined action of oxygen and food, be most favorably situated for growth and increase. Thus in fact, *Spirillum tenue* is aërophilous as to growth and microaërophilous as to mobility.

Beside to this peculiar form of »trophotropy« in the growth, one has to pay attention, when studying the figures of respiration, to a phenomenon of almost the same nature with respect to the mobility, and which may be called »trophotaxis«. It consists in the accumulation of the mobile microbes, which are more attracted by the food than by the oxygen, not in the meniscus and at the edge of the preparation, but at some distance. I observed this in an aërobic species, which I have called *Bacillus perlibratus*, where trophotaxis may become so strong, that microaërophily is mimicked, and was erroneously described by me as such [2]).

With abundant food, however, nothing is to be seen of these phenomena, so that by attentive observation microaërophily may always distinctly be recognised.

I now return to the anaërobes of the putrefaction of proteids, and in particular to the second important form, the skatolbactery. Of this polymorphous form I examined, as already said, material closely allied to the tetanus-bacillus, which material is strictly anaërobic, and perhaps ought to be considered as the most characteristic

[1]) Archives Néerlandaises, T. 29, pag. 272.

[2]) Centralblatt für Bacteriologie, Bd. 14, pag 830, 1893.

for the process of putrefaction in general. I isolated various varieties and by means of growth experiments I was enabled to state microaërophily. The mobility of my varieties was too insignificant to be of use for the production of figures of respiration. When using the above mentioned pepton gelatine as nutrient matter and *Saccharomyces apiculatus* for the absorption of oxygen, most convincing »niveaus«, of a light brown color and with much growth, originate in deep experiment-tubes at a certain distance from the surface, in the surface itself the transparent clear colonies of the apiculatus-yeast develop vigorously, the skatolbacteria not being able to develop there.

The spore-formation seems here also to be favored by a small quantity of oxygen. Certain it is that spores are the most profusely formed in the niveau, and as their production goes parallel, first to the weakening and then to the complete liquefying of the gelatine, it is clear that also the latter process must begin in the niveau, to become only much later perceptible in the depth, and without reaching the surface at all.

I wish to terminate this survey of the obligatous anaërobics, studied by me, with the statement that the existence of microaërophily could also be proved for *Spirillum desulfuricans* by means of growth experiments.

This species is, in opposition to *S. tenue,* strictly anaërobic and belongs morphologically to quite another group than the butyricferments and the bacteria of putrefaction, which is clearly demonstrated as well by the vibrio- or spiril-form, as by the absence of spores [1]).

If sown in pepton gelatine, with Mohr's salt and an aërobic bactery (*B. termo*) for the absorption of oxygen, in deep experimenttubes, the microaërophily becomes visible by a black »niveau« of ferrosulfid, first formed at some distance beneath the surface and thence, only slowly, growing towards the depth and upward. When microscopically examined this niveau proves to be richest in reducing spirilli, so that evidently not the function of the sulphate reduction as such, but the growth of the *Spirillum*, active in this process, is furthered by a low oxygen tension.

It is fit here to make a few remarks concerning the relation of facultative anaërobics to free oxygen. By far the greater part of facultatives is aërophilous. I mention for instance *Mucor racemosus*, all alcohol yeasts, *Bacterium coli commune, B. lactis aërogenes, Granulobacter polymyxa, Bacillus tuberculosis, B. prodigiosus.* If the production of figures of respiration is possible, then the width of the moving bacteria zone is very great, even in dense swarms, which indicates a slow consumption of oxygen. This is especially the case with the fermenting species, as *coli* and *aërogenes*, and sometimens, too, with not fermenting species, such as *Bacillus tuberculosis* [2]).

Microaërophilous are among the facultatives, so far as I think I can assert now, only the true lactic ferments, which may be brought to two groups of which the most important representatives are: *Bacterium lactis* (of buttermilk), and *Bacillus longus* (of cheese and of the yeast industry).

As these forms have no motion and produce little living matter in growing, the total quantity of absorbed oxygen is very small, whence the experiments are

[1]) As I think the only well-described instance of a spore-free obligatous anaërobic.

[2]) The mobility of *Bacillus tuberculosis* has first been seen by Mr. MacGillavry. The figures of respiration are troublesome to obtain and only with quite young cultures, as for instance of flesh bouillon agar, not older than 24 hours.

difficult and subject to doubt. If sown, however, in a proper solid culture mass, to which calcium carbonate is added, in a deep experiment-tube, it may be observed that, under favorable circumstances, at a certain depth below the surface, the formation of acid is the most vigorous. This is caused by the existence of a niveau, very rich in bacteria if compared with deeper layers where less, as well as with those nearer to the surface, where more oxygen is present. After some time, however, so many colonies originate, as well at the surface as in the depth, that the microaërophily grows indistinct, without changing into aërophily.

Recapitulating, and adding some instances not yet mentioned, I come to this conclusion:

Aërophilous are: All aërobic bacteria (except some spirilli), most facultative anaërobics, probably all cells of higher animals and plants, most infusoria.

Microaërophilous are: The few hitherto examined obligatous anaërobics, to which belong also the chromatia and other sulphurbacteria, and *Spirillum desulfuricans*. Of the facultatives probably all lactic ferments, besides some (perhaps many) species of monads, and some infusoria.

Aërophilous with regard to growth, microaërophilous with regard to motion are: Some true spirilli, perhaps also some monads.

Though nobody will be surprised that, in reason of the above observations, I believe that all living organisms known at present, require free oxygen for their existence, I am far from pretending to have furnished the entire proof for that belief. It may even be asked whether there is cause to speak of »want« of free oxygen, and if »use of it if accessible« were not more adequate.

With regard to the examined obligatous anaërobics I have only shown that an extremely small quantity of free oxygen is propitious to their growth and mobility, but not yet that in the long run they would perish without it [1]).

I must however insist on this being positively the case with the aërophilous facultative anaërobics, such as alcohol ferments, *B. coli commune*, etc. If these are prevented from laying in a »provision« of oxygen, on which to live when this gas fails, the growth soon ceases and, even with the best food, life too [2]). This fact is very singular, for the extremely small quantities here concerned, are nothing as to the development of energy.

Consequently it is not clear why the combined oxygen, which abounds in the food, cannot here fill the place of free oxygen. With the unknown signification of the latter it is, to be sure, quite uncertain whether there must exist a minimum limit beneath which the possibility of life is totally excluded; but as this limit does certainly exist fort the facultatives, one is by analogy inclined to accept its existence every-

---

[1]) Experiments in this latter direction have not yet given any sure results and have only proved that, with apparently efficacious precautions, anaërobiosis without access of air can long go on. So I could, without supply of air, make seven butylic fermentations go on successively, but at the seventh there arose some doubt whether the bacteria had varied or that an infection from without with butyric ferment had occurred.

[2]) For this reason I formerly proposed to call these organisms »temporary anaërobics«, but now that I am more and more convinced that also the »obligates« can exist only temporarily without free oxygen, I no more attach much value to that term

where, consequently for the obligatous anaërobics, too. That is, for them also, to recognise free oxygen as a necessity for existence.

This opinion has the more weight now that it has been proved how easily may be shown that they not only *use* free oxygen but if possible, *seek* it and that it may promote even such important functions as growth and mobility.

Without doubt, this points to something more than »use«, albeit the term »want« goes perhaps too far. As it is however a fact that the obligatous anaërobics can produce thousands of new generations without a renewed contact with free oxygen, the hypothesis demands the acceptance of a peculiar exciting action of the free oxygen, stored up as a provison in the body of the bacteria.

This action cannot be compared to that of kalium, or of magnesium, or of the other elements necessary for life in small quantities. In the first place, because the latter must be present in quantities of another order, quantities gigantic compared to that of the oxygen provision; secondly and especially, because these elements may be withdrawn from the most different chemical compounds. The very necessity of the oxygen being free, causes the difficulty of giving a definite representation of its function. Some light would go up if it could be proved, that in the food a loosely bound form of oxygen might occur, accessible to the anaërobics, and Pasteur has indeed supposed that the oxygen, which is found in beer wort, and cannot be separated from it by pomping or boiling, makes the anaërobiosis of beer yeast possible.

Facts are however not in accordance with this hypothesis. Now, as in the case of beer yeast and the other facultative anaërobics, we are obliged to admit the existence of a store of free oxygen in the cell itself, which, in a way hitherto unexplained, makes a temporary anaërobiosis possible, analogy, supported by the observations here described, leads to the same conclusion for the obligatous anaërobics.

Bemerkung zu dem Aufsatz von Herrn Iwanowsky über die Mosaikkrankheit der Tabakspflanze[1]).

Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde, Jena, II. Abteilung, V. Band, 1899, S. 310—311.

Ich bestätige gern, dass, wie ich nun sehe, die Priorität des Versuches mit dem Bougiefiltrat Herrn Iwanowsky zukommt[2]); beim Abfassen meiner Arbeit kannte ich seine und Herrn Poloftzoff's Abhandlungen nicht.

In Bezug auf die Unterscheidung von »Mosaik«- und »Pockenkrankheit« wünsche ich Folgendes zu bemerken:

Dass die braunen abgestorbenen Gewebeflecke sehr oft, wenn auch nicht immer, das Ende der Mosaikkrankheit bezeichnen, bleibt meine Meinung. Dass die Transpiration deren Entstehung begünstigt, kann ich durchaus bestätigen. Ebenso, dass ähnliche »Pocken« unabhängig von der Mosaikkrankheit entstehen können. Ich kann dafür selbst eigene spezielle Versuche anführen. Als ich nämlich noch in derjenigen Periode meiner Untersuchung war, wo ich glaubte, dass Bakterien oder deren Absonderungsprodukte die Mosaikkrankheit verursachen, begann ich schon die Pflanzen mit allerlei chemischen Körpern einzuspritzen. Die Meinung, dass die Krankheit zunächst eine Chlorophyllkrankheit ist, veranlasste mit Stoffen zu experimentieren, welche Eisensalze binden. Dabei sah ich, dass Ferrocyankalium besonders geeignet ist, »braune tote Gewebeflecke« zu erzeugen, ähnlich denjenigen, welche ich so oft am Ende der Mosaikkrankheit gesehen hatte, jedoch sind sie gewöhnlich ausgedehnter. Tannin kann dieses ebenfalls thun, wenn auch erst bei sehr hoher Konzentration, z. B. bei der Einspritzung 5-proz. Lösungen. Dasselbe verursacht dann noch überdies Blattdeformationen, welche denjenigen der Mosaikkrankheit insoweit ähnlich sind, dass auch dabei Hemmung des Längenwachstums der Blattnerven vorkommt. Bekanntlich zeigen auch die weißen Partieen albicater Blätter oft ein vorzeitiges Absterben der Gewebe, besonders bei starker Transpiration, und es wäre leicht, noch andere Beispiele für die Entstehung solcher Erscheinungen namhaft zu machen. Dass die »toten Flecke« nicht den Hauptcharakter der Krankheit bezeichnen und dabei gänzlich fehlen können, habe ich, wie Herr Iwanowsky selbst hervorhebt, auch in meiner Abhandlung gesagt.

Mein Agarversuch erscheint Herrn Iwanowsky nicht als einwandsfrei. Da er nicht sagt weshalb, will ich selbst eine Einwendung dagegen hervorheben. Mehrere

[1]) Dies. Centralbl. Bd. V. No. 8. p. 250.

[2]) Die Stelle findet sich: Mélanges Biologiques. T. XIII p. 237 und Bulletin de l'Acad. Impér. d. sc. de St. Pétersbourg. T. XXXV. 1894. p. 67

Mikroben wachsen ziemlich tief in Agar-Agar hinein und könnten so dem oberflächlich liegenden Virus einen Weg bahnen, um in die Tiefe zu dringen ohne eigentliche Diffusion. Da ich dieses im vorliegenden Falle als möglich voraussetzte, experimentierte ich derart, dass darin keine Fehlerquelle liegen konnte, nämlich durch den Gebrauch von sterilem Saft kranker Pflanzen. Ich erhielt diesen auf zwei Weisen, 1. als Bougiefiltrat, 2. aus steril kultivierten, kranken Sprossen. Solche sterile kranke Sprosse sind leicht dadurch zu erhalten, dass man eine Pflanze unter einer Glasglocke aufwachsen lässt. Selbst die Oberfläche der Blätter, worauf gewöhnlich viele Bodenbakterien vorkommen, bleibt dabei völlig steril, weil die jungen Blätter aus dem Vegetationspunkt steril hervorsprossen und dann später nicht mehr infiziert werden. Mit dem völlig keimfreien Agar aus der Tiefe konnte die Krankheit erzeugt werden, so dass ich die Diffusionsfähigkeit des Virus als sichergestellt betrachten muss.

Hier will ich noch hervorheben, dass weder der Wundreiz allein, noch Einspritzungen mit Leitungswasser, mit dem Safte völlig gesunder Pflanzen oder mit Nicotinlösungen die Mosaikkrankheit verursachen.

Da die übrigen Angaben von Herrn Iwanowsky nur eine Bestätigung und Erweiterung meiner Angaben bringen, ohne die Frage zu vertiefen, verschiebe ich eine weitere Besprechung des durchaus noch nicht erschöpften Gegenstandes bis auf später.

Ueber Glukoside und Enzyme in den Wurzeln einiger Spiraeaarten.

Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde, Jena, II. Ableilung, V. Band, 1899, S. 425—429.

Die Wurzeln, die Rhizome und die unteren Teile des Krautes von Spiraea ulmaria, S. filipendula und S. palmata enthalten ein Glukosid, Gaultherin, und ein Enzym, Gaultherase, welche bei der Vermischung Methylsalicylat (Gaultheriaöl) erzeugen. Bei S. kamschatica enthalten die älteren Wurzeln und Rhizomteile ebenfalls Gaultherin, jedoch gesellt sich in den jüngeren Teilen dazu ein zweites Glukosid, Spiräin, welches durch Einwirkung von Gaultherase Salicylaldehyd abspaltet. Spiräin und Gaultherase finden sich ebenfalls in den oberirdischen krautartigen Teilen von S. ulmaria.

Gaultherin. Das Glukosid des Gaultheriaöls, scheint schon im Jahre 1844 von Proctor in der Rinde von Betula lenta L. erkannt zu sein (siehe unten). Zur Darstellung desselben, allerdings in rohem Zustande, verfahre ich folgendermassen: Wurzelknollen von Spiraea filipendula werden vorsichtig und ohne Zerquetschung der Gewebe in Scheiben geschnitten und diese allmählich in stark kochendes Wasser oder in kochenden Alkohol eingetragen. Das Enzym wird dadurch vernichtet, während das Glukosid in Lösung geht. Durch Eindampfen dieser Lösung enthält man eine klebrige Masse, worin das Glukosid im amorphen Zustand. Durch wiederholtes Extrahieren mit Alkohol, Filtrieren und Eindampfen konnte dasselbe nicht zur Krystallisation gebracht werden, so dass es noch nicht in reinem Zustand bekannt ist.

Gaultherase. Zur Darstellung dieses Enzyms werden die lebenden Wurzeln von Spiraea filipendula nach vorhergehender roher Zerkleinerung in einem Mörser langsam und völlig bei Zimmertemperatur oder gelinder Wärme zerrieben. Dadurch werden die Zellen geöffnet und das Glukosid und das Enzym, welche in den Zellen getrennt vorkommen, kommen miteinander in Berührung, wodurch das Glukosid gespalten wird. Wenn man annimmt, dass die Reaktion beendigt ist, wird die teigige Masse entweder sofort oder nach vorheriger Extraktion mit Alkohol bei Brüttemperatur getrocknet und pulverisiert. Man erhält dabei ein geruchloses Pulver, welches, mit dem rohen Glukosid in wässeriger Lösung zusammengebracht, sofort Gaultheriaöl entwickelt.

Wird das enzymhaltige Pulver mit Wasser extrahiert, das Extrakt mit Alkohol präcipitiert und das Präcipitat abfiltriert und getrocknet, so erhält man ebenfalls ein

aktives enzymhaltiges Präparat. Das Enzym ist also in Wasser löslich und wird weder durch Trocknen noch durch starken Alkohol vernichtet.

Salicin und Amygdalin werden durch das Enzym nicht gespalten, woraus hervorgeht, dass dasselbe nicht identisch mit Emulsin sein kann, sondern einen neuen Enzymtypus darstellt. Hiermit in Uebereinstimmung ist das Emulsin, aus süssen Mandeln dargestellt, auch ohne Wirkung auf Gaultherin.

Gaultheriaöl. Zur Darstellung desselben verfährt man genau so, als ob man das Enzym anfertigen wollte, destilliert aber die zerriebene Masse mit einem Wasserdampfstrome über. Im wässerigen Destillat ist das Oel zu ca. 0,1 Proz. löslich; ist diese Grenze erreicht, so sinkt es in schweren Tropfen im Wasser zu Boden.

Das Gaultheriaöl wurde im Jahre 1843 zum ersten Male dargestellt durch Cahours[1]) aus der Ericacee Gaultheria procumbens L. Im Jahre 1844 bereitete Proctor das Oel aus der Rinde von Betula lenta L. und machte es, wie oben schon angedeutet, wahrscheinlich, dass es darin nicht vorgebildet ist, sondern durch die Hydrolyse eines Glukosids entsteht, welches er Gaultherin nannte[2]). Bourquelot, welcher Methylsalicylat aus dem Blütenstand von Monotropa hypopitys erhielt[3]), vermutet, dass Proctor's Gaultherin in dieser Pflanze vorkommt und Ursubstanz des Oels sei.

Im Jahre 1874 zeigte Nietzki[4]), dass sich aus den Wurzeln und den unteren Teilen des Krautes von Spiraea ulmaria Gaultheriaöl darstellen lässt. Da er jedoch nicht wusste, dass das Oel durch Spaltung eines Glukosids entsteht, wählte er ein schlechtes Verfahren zur Darstellung desselben, nämlich durch direkte Destillation, während er zuvor das Material völlig hätte zerreiben müssen. Er erhielt deshalb aus 20 Pfund Ulmariawurzeln nur eben genug, um sicher zu zeigen, dass das Oel mit Salicylsäure, und mit einigem Zweifel, dass dasselbe mit Kali Kaliumsalicylat und Methylalkohol liefert.

Schneegans und Gerock[5]) fanden, dass Gaultheriaöl auch aus den Blütenknospen von Spiraea ulmaria zu gewinnen ist[6]).

---

[1]) Journal de Pharmacie et de Chimie. Mai 1843.

[2]) The American Journal of Pharmacy. T. XV. 1844. Januar. p. 241.

[3]) Comptes rendus. T. CXIX. 1874. p. 802.

[4]) Ueber das ätherische Oel der Wurzel von Spiraea ulmaria (Archiv der Pharmacie. Jahrg. LIII. 1874. p. 420).

[5]) Journal der Pharmacie für Elsaß-Lothringen. 1892. p. 3 u. 55.

[6]) Gaultheriaöl wurde bisher, außer in den im Text genannten Spiräen, nach E. Kremers und Martha M. James (On the occurence of Methylsalicylate, Pharmaceutical Review. Vol. XVI. 1898. p. 100) aus den folgenden Pflanzen bereitet: Betulaceae: Betula lenta (»From specimens of the bark, collected by Prof. True it becomes apparent that the glucosid yielding methylsalicylate, is contained not only in the bark of the stem, the branches and the twigs, but of the roots as well«); Lauraceae: Lindera benzoin; Erythroxylaceae: Erythroxylon coca; Polygalaceae: Polygala senega, P. Baldwini, P. variabilis, P. oleifera, P. javana, P. serpillacea, P. calcarea, P. depressa, P. vulgaris; Pyrolaceae: Monotropa hypopitys; Ericaceae: Gaultheria procumbens, G. fragantissima (= G. punctata, = G. leschenaultii) und G. leucocarpa. Sawer (Odorographia, 2nd Series. p. 340. London 1894) erwähnt noch Gaultheria odorata Humb. und G. serpyllifolia Pursh. Die Kenntnis der hier referierten Abhandlungen verdanke ich Prof. Wijsman in Leiden.

Spiräin. Pagenstecher hatte aus den Blüten von Spiraea ulmaria schon im Jahre 1834 Salicylaldehyd gewonnen[1]) und Wicke zeigte[2]), dass Salicylaldehyd ebenfalls entsteht bei der Destillation des Krautes dieser Pflanze, sowie von S. filipendula, S. digitata und S. lobata. Er vermutete, das Oel komme darin nicht fertig gebildet vor, sondern es sollte aus »Salicin« abgespalten werden.

Als ich im März 1898 bemerkte, dass sich aus den unterirdischen Teilen von Spiraea kamschatica sowohl Salicylaldehyd wie Gaultheriaöl darstellen lässt, legte ich mir die Frage vor, wie das Salicylaldehyd darin vorkommt. Es ergab sich, dass bei gleicher Behandlungsweise, wie für das Gaultherin angegeben, aus den älteren Rhizomteilen und den daran vorkommenden Wurzeln nur Gaultherin erhalten wird, und dass die jüngeren Teile dabei ein anderes Glukosid, entweder allein oder mit Gaultherin gemischt, ergeben. Dieses Glukosid konnte ebenfalls nur amorph erhalten werden und mag Spiräin genannt werden. Wird die wässerige Lösung desselben mit Gaultherase zusammengebracht, so wird Salicylaldehyd abgespalten. Emulsin zerlegt dasselbe nicht. Es ist nach diesem Befund wohl nicht daran zu zweifeln, dass auch in Spiraea ulmaria die beiden Glukoside Spiräin und Gaultherin nebeneinander vorkommen.

Merkwürdigerweise geht aus der Beschreibung von Wicke hervor (l. c. p. 176), dass im Destillate des Krautes von Spiraea aruncus Cyanwasserstoffsäure, jedoch ohne gleichzeitige Gegenwart eines ätherischen Oeles, vorkommt. Wicke schreibt dieses der Zersetzung von »Amygdalin« zu. Weil er jedoch nachdrücklich sagt, dass er im Destillat der Spiräen entweder nur Blausäure oder Salicylaldehyd erhalten hat, und Benzaldehyd ihm natürlich nicht entgangen sein würde, ist die Gegenwart von gewöhnlichem Amygdalin oder von einem Salicylaldehyd abspaltenden »Amygdalin« in den Spiräen vorläufig nicht anzunehmen. Da ich bei der Spaltung von Gaultherin und Spiräin keine Blausäure nachweisen konnte, ist die Herkunft desselben noch unerklärt und fordert zu weiteren Untersuchungen auf.

Die biologische Bedeutung der hier besprochenen Körper dürfte klar genug sein. Die Wurzeln von Spiraea filipendula z. B. sind essbar, sobald das Oel daraus entfernt und der hohe Tanningehalt verringert ist. Es ist darum sehr wahrscheinlich, dass das stark riechende Öl der Pflanze Schutz verleiht gegen nagende Insekten, vielleicht auch gegen Feldmäuse. Dass es für die Pflanze wichtig ist, so flüchtige Öle, wie Methylsalicylat und Salicylaldehyd nicht fertig gebildet zu enthalten, sondern erst im Momente des Bedürfnisses in Freiheit zu setzen, liegt auf der Hand, und wie konnte dieses besser erreicht werden, als durch die Gegenwart eines Enzyms, welches getrennt vom Glukosid vorkommt, jedoch im Augenblick einer Verwundung sich damit mischt und dann auch sofort das Öl in Freiheit setzt? Bekanntlich findet auch dasselbe statt bei anderen glukosidhaltigen Pflanzen, wie z. B. bei vielen Cruciferen und der Kapuzinerkresse, worin ebenfalls lokalisiert ein Enzym, das Myrosin, und gewisse Glukoside vorkommen, welche bei der Verwundung zu einer Reaktion Veranlassung geben, wobei äusserst scharf schmeckende oder riechende Körper in Freiheit gesetzt werden, welche zu der Gruppe der Senföle gehören und von welchen man annehmen muss, dass sie Insekten oder andere Tiere fernhalten.

[1]) Journal für praktische Chemie. Bd. LIX. 1834. p. 51.

[2]) Zur Physiologie der Spiräen (Annalen der Chemie und Pharmacie. Bd. LVI. 1852. p. 175).

Zu dieser mehr oder weniger wahrscheinlichen Funktion der flüchtigen Oele aus den Glukosiden konnte ich noch eine andere Wirkung derselben feststellen, welche ich hier kurz angeben will. Es handelt sich um die Wirkung derselben auf gewisse Mikroben, besonders auf Saccharomyceten und gewisse Schimmelarten. In bestimmten Fällen ist diese Wirkung eine erstaunlich intensive. So sind z. B. äusserst geringe Spuren des Kapuzinerkressenöls zureichend, um das Wachstum von Saccharomyces mycoderma vollständig zu unterdrücken. Weil dieses Oel auf Milchsäurefermente und Essigbakterien viel weniger heftig einwirkt, lässt sich darauf eine Methode gründen zur physiologischen Selektion dieser Bakterien aus Materialien, welche zu gleicher Zeit Kahmpilze enthalten. Für die Haushaltung ist diese Bemerkung insoweit wichtig, weil darin die Erklärung gegeben ist für den Gebrauch von Samen der Kapuzinerkresse (auch weisse Senfsamen sind dafür zu verwenden), um der Kahmbildung auf saueren Gurken und anderen ähnlichen Konserven vorzubeugen.

Gadamer's Ansicht (Archiv d. Pharmacie, Bd. CCXXXVII, 1898, p. 111), nach welcher das Glukosid der Kapuzinerkresse Benzylsenföl abspalten soll (das hierbei wirksame Enzym ist, wie gesagt, Myrosin), kann ich nicht beipflichten, denn der Versuch lehrte, dass Benzylsenföl erst in sehr viel grösseren Quantitäten das Wachstum von Sacch. mycoderma aufhebt, wie das natürliche Kressenöl (Benzylrhodanid und Benzylcyanid wirken noch viel schwächer). Auch gelang es nicht, das natürliche Kapuzinerkressenöl unzersetzt zu destillieren; es spaltete dabei Schwefel ab und wurde in Bezug auf S. mycoderma viel weniger aktiv. Ich habe Ursache, zu vermuthen, dass hier ein Oxybenzylsenföl vorliegt.

Da es sich herausgestellt hat, dass auch das Gaultheriaöl das Wachstum des Kahmpilzes schon bei einer Konzentration von 0,1 Proz. (ungefähr soviel löst sich im Wasser) verhindert, nehme ich an, dass eine weitere Funktion der hier in Betracht kommenden Körper das Fernhalten pflanzlicher Parasiten aus der Gruppe der Pilze sein muss, und es frägt sich, ob diejenigen Glukoside und ihre Enzyme, welche unter bestimmten Bedingungen dergleichen intensiv wirkende Körper in Freiheit stellen können, nicht in technischer Beziehung für den Pflanzenschutz im Grossen nützlich werden könnten. In physiologischer Beziehung betrachte ich solche Glukoside, wie Gaultherin und Spiräin, einstweilen als Endprodukte des Stoffwechsels, ähnlich wie die Gerbstoffe, mit dem Unterschiede aber, dass der bei ihrer Spaltung freikommende Zucker zur Ernährung der verwundeten Gewebe wird dienlich sein können.

On the Formation of Indigo from the Woad (Isatis tinctoria)[1].

Proceedings of the Section of Sciences, Kon. Akademie van Wetenschappen, Amsterdam, Vol. II, 1899, blz. 120—129. — Verscheen onder den titel »Over de indigovorming uit de Weede (Isatis tinctoria)« in Verslagen Kon. Akademie van Wetenschappen Wis-en Natuurk. Afd., Amsterdam, Deel VII, 1899, blz. 91—99.

Some years ago I wished to become acquainted with the so-called »indigo-fermentation«, about which nearer particulars had been communicated by Mr. Alvarez. He examined *Indigofera* and says[2]:

»If a decoction of the plant is prepared and sterilised after passing it into test-tubes or Pasteur's-flasks, the reddish colour of the liquid remains many months unchanged without the appearance of indigo. But if some microbes of the surface-membrane of an ordinary indigo-fermentation are added, as also the special active bactery of it in an isolated condition, after some hours an abundant indigo-formation is observed.«

I then tried to make from woad (*Isatis tinctoria*), in which, according to the literature, indican, i. e. the same indigo-producing substance as in the other indigo-plants should be present, a decoction with which I might repeat the experiment of Alvarez. But I could, neither by boiling, nor by extraction at low temperature, obtain from this plant a sap which remained unchanged at the air. Constantly, after a sort time, indigo will separate out of it, without there being any question of the influence of bacteria or enzymes, so that the word »indigo-fermentation« would here be quite misplaced. Neither do purposely added bacteria or enzymes favour the indigo-formation from woad-decoction.

Later, however, I was enabled to convince myself that the statement of Alvarez is correct, as well with regard to the decoction of *Indigofera leptostachya* as to that

---

[1]) It was first my intention to treat »On the function of enzymes and bacteria in the formation of indigo«. I have declined this plan for the moment, and give now only part of my experiments, because I see that also Mr. Hazewinkel, of the Experimentstation for Indigo at Klaten, Java, has obtained important results about that very subject, which results, for particular reasons, have however been imparted till now to a few experts only. Yet I cannot avoid mentioning some facts, found by me, the priority of which perhaps pertains to Mr. Hazewinkel, without my being able to acknowledge his claim. One indiscretion, however, I am obliged to commit: Mr. Hazewinkel has, already before me, established the fact, that by the action of the indigoenzyme and of acids on indican, indoxyl is produced.

[2]) Comptes rendus, T. 105, pag. 287, 1887.

of *Polygonum tinctorium* [1]), for which latter plant the same fact as described by Alvarez, has also been established by Molisch [2]).

So it was evident that the indigo-plants must belong to two physiologically different groups, and I subjected the concerned chromogenes to a further examination with the following results.

1. *The Chromogene of the Indigo-plants is Indoxyl or Indican.*

The chromogene of woad is not as is usually accepted indican, but the very instable indoxyl C^8H^7NO. *Indigofera leptostachya* and *Polygonum tinctorium,* on the contrary, contain the constant glucoside indican, the constituents of which are, in accordance with the supposition of Marchlewski and Radcliffe [3]), indoxyl and sugar, which has first been brought to certainty by Mr. Hazewinkel, and, without my knowing of his experiments, by myself. Woad, as an »indoxyl-plant« containing no indigo-glucoside, wants also an enzyme to decompose it. The two mentioned »indican-plants«, on the other hand, do contain such an enzyme, which had already in 1893 been rendered probable by Mr. van Lookeren Campagne with regard to *Indigofera* [4]). I have prepared this enzyme, albeit in a very impure state, in rather great quantity and I hope afterwards to describe the experiments made with it.

The important difference between »indoxyl-« and »indican plants« becomes particulary clear when comparing the different extraction methods. Thereof what follows.

If »indican-plants« are extracted with water below the temperature at which the indigo-enzyme becomes inactive, for instance below 40° C. or 50° C. (»cold extraction«), and under careful exclusion of air, an indoxyl-solution is obtained. If, however, the same »indican-plants« are extracted by boiling (»decoction«), the indigo-enzyme will be destroyed, and independently of removal or access of air, an indican-solution results, which can be kept perfectly unchanged when microbes are excluded, but either by the separately prepared indigo-enzyme, or by certain bacteria or yeasts, or also by boiling with acids, it can be converted into the constituents indoxyl and sugar. I have prepared from it the crude indican in a dry state, by evaporating to dryness the decoctions of both *Indigofera leptostachya* and *Polygonum tinctorium.* The brown matter, thus produced, resembles sealing-wax, is very brittle and can quite well be powdered.

---

[1]) Much material of this *Indigofera*, as well full grown plants as seeds, I owe to the kindness of Mr. van Lookeren Campagne of Wageningen. This interesting plant, a native of Natal, has been cultivated, very rich in indican, in the open ground in the Laboratory-garden at Delft; at Wageningen several specimens had grown this summer to more than 1.5 M. height.

Polygonum tinctorium comes from China and is, as the woad, in the seed-commerce of Vilmorin in Paris.

[2]) Sitzungsber. d Akad. d. Wissensch. zu Wien. Math. Naturw. Klasse, Bd. 107, pag. 758, 1898.

[3]) Journ. Soc. for chem. Industry, T. 87, pag. 430, 1898; Chem. Centralblatt, Bd. 65, pag. 204, 1898. With thankfulness I remember the aid lent me by my chemical colleagues Hoogewerff and Behrens in the determination of indoxyl.

[4]) Verslag omtrent onderzoekingen over indigo, pag. 12, Samarang 1893.

Woad on the contrary, as an »indoxyl-plant«, both by »cold extraction« and by »decoction« always gives the same produce i. e. an indoxyl-solution. Here, in both cases, the greatest care must be taken to exclude the air in order to prevent that the indoxyl, which is so easily oxidised, is converted already in the leaf itself, for then the indigo-blue is lost. Besides, access of air in a dying wood-leaf gives still in another way cause to loss of indoxyl under formation of unknown colourless and brown substances.

A sufficient removal of air during the preparation of the extracts is easily effected in the following way [1]). A well closing, widemouthed stoppered bottle is quite filled up with woad-leaves, hot water is poured in, the leaves are pressed together until all air is replaced, and the stopper is put on so as not to leave the smallet air-bubble. By the exclusion of the air, together with high temperature, the leaves soon die and already after a few hours a clear, light yellow liquid can be decanted, which is rich in indoxyl. If some alkali is added and air blown through, the indigo-blue precipitates, the colour of which appears only pure after acidification. In a sufficient time of extraction there can be thus obtained from woad a liquid of which the proportion of indoxyl, according to Reinwardt [2]) who in 1812 applied the decoction-method on a rather large scale, answers to 0.3 pCt. »pure indigo« for the fresh leaves, which, as he remarks, might rise to the double amount in the South. If we consider that the indoxyl is especially concentrated in the youngest organs still in a state of cell-partition, that it diminishes considerably in full grown parts, and is almost or wholly absent in old leaves, we must conclude that the youngest organs may contain more than 0.3 pCt. indigo. As the woad-leaves contain about 85 pCt. water this would correspond to a little less than 2 pCt. indoxyl in the dry matter [3]).

The indoxyl-containing sap, whether prepared by »cold extraxtion« from the indican-plants or by decoction from the indoxyl-containing woad, has the following characteristics. It is a light yellow, in cold greenish fluorescent fluid; at warming the fluorescence diminishes and comes back at cooling. The reaction is feebly but distinctly acid, of course not by the neutrally reacting indoxyl but by organic acids. At the air a copper-red film of indigo-blue is formed at the surface of the liquid.



$$2(C^8H^7NO) + O^2 = C^{16}H^{10}N^2O^2 + 2H^2O,$$

but this oxidation follows so slowly in the feebly acid solutions, that evaporating to dryness at the air is possible without too much loss of indoxyl. The indoxyl itself is

---

[1]) The technical preparation of indigo from woad is described in Giobert, Traité sur le Pastel, Paris 1813, and in De Puymaurin, Instruction sur l'art d'extraire l'Indigo du Pastel, Paris 1813.

[2]) In a report of 6 December 1812 to the President of the Agricultural Comittee for the Department of the Zuiderzee, present as a manuscript in the library of the Academy of Sciences, Amsterdam.

[3]) But according to Georgevics, Der Indigo, pag. 2 and 18, Wien 1892, the rate of indigo for woad would only amount to 0.03 pCt. In my laboratory Mr. van Hasselt found in three special cases 0.05 pCt., 0.07 pCt. and 0.09 pCt. indigo-blue in relation to the weight of the living leaves, which latter amount corresponds to ca. 0.6 pCt. indoxyl with regard to the dry weight

soluble in water, ether, alcohol and chloroform, in the two last under slow decomposition when the air finds access.

As soon as the liquid becomes alkaline, however feebly, the indoxyl oxidises at the air with much greater quickness to indigo-blue.

The statement of Bréaudat[1]), that in the sap of *Isatis* there would be present an oxidase, by which this oxidation is effected, is not proved; in none of the three indigo-plants I have been able to find an oxidase producing-blue from indoxyl. For, by preparing from the woad-leaves »crude enzyme« by finely rubbing them under, and extracting them with strong alcohol, whereby, after pressing and drying, a completely colourless powder is obtained in which all the enzymes must be present, it is found that the oxidising effect of this »crude enzyme« on an indoxyl-solution is very slight, ceases soon, and does not change by boiling, from which must be concluded that the oxidation cannot be attributed to oxidase, but is of a purely physical nature[2]).

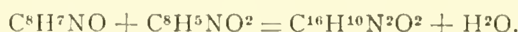
The leaves of the indican-plants give quite the same result.

Though there originates during the slowly dying of woad-leaves at the air, a substance which gives rise to a total destruction of the indoxyl, yet about the nature of it I cannot express a supposition. If it might prove to belong to the group of the oxidases, it is surely in no other relation to the formation of indigo from indoxyl, than that it is very pernicious to it. For the indican-plants the same has been observed. In *Indigofera* this destructive influence is so strong that the »alcohol-experiment«, of which later, wholly fails with this plant.

Hydrogen-superoxyd, too, causes the indoxyl gradually to vanish from the solutions, without any coloured products originating.

Strong acids, just as alkalis, though in far less degree, favour the formation of indigo from indoxyl, but then part of this substance constantly changes into a brownish-black matter.

In feebly alkaline and in moderately acid solutions, indoxyl, warmed with isatine gives, in absence of air, a precipitate of indigo-red, which is isomeric with indigo-blue



$$C^8H^7NO + C^8H^5NO^2 = C^{16}H^{10}N^2O^2 + H^2O.$$

This precipitate separates quickly out of alkaline solutions as fine red, from acid ones as coarser dark crystal-needles and can easily be filtered. It is soluble in alcohol and so can be separated from the indigo-blue. On warming an indican solution with isatine and dilute hydrochloric acid, all the indoxyl which is set free precipitates as indigo-red, and I presume that a good quantitative indican determination may be based upon this reaction.

All the here mentioned characteristics of the indoxyl-containing plant-saps are also announced in the literature of the chemically prepared indoxyl, except the conduct towards isatine and hydrochloric acid which has perhaps not been examined.

Natural indigo prepared from woad, contains a small quantity of indigored; but whether this originates from the same indoxyl as the blue, or from an isomeric indo-

---

[1]) Comptes rendus, T. 127, pag. 769, 1898, en T. 128, pag. 1478, 1898.

[2]) In a small porcelain vessel the menisc of the fluid furthers the oxidation of indoxyl to indigo blue just in the same way as »crude-enzyme«, strewed as a powder on the surface of the liquid.

xyl, I cannot decide. Indigo-red I could also find in the indigo made from indican, whether chemically by boiling with acids, or by bacteria, or by enzymes. Consequently, if two indoxyls should exist, there should also exist two indicans.

2. *Demonstration of Indigo in the Indigo-plants themselves.*

For the demonstration of indigo in the plants themselves, Mr. Molisch described in 1893 his »alcohol-experiment« to which he afterwards repeatedly recurred [1]). In this experiment the parts of the plants to be examined are exposed, in a confined atmosphere, to alcohol- or chloroform-vapour, for instance by putting them into a glass-box, in which a small vessel with these substances is placed. Thus slowly dying all the indigo-plants become more or less blue, which is perceptible after the chlorophyll has been removed by extraction with alcohol. I found, however, that never all the present indoxyl or indican changes into indigo. The »alcohol-experiment« succeeds the best with *Polygonum tinctorium*, where at least most of the indoxyl changes into indigo. For woad the result is greatly dependent on the length of time which the experiment requires, even on the season, but invariably only a part, though it may be a great part, of the indoxyl passes into indigo. With *Indigofera* only a little indigo precipitates in the youngest leaflets and buds, while the older leaves become quite colourless by the alcohol-extraction though they are extremely rich in indican, so that, for this plant, the »alcohol-experiment« is without any value [2]).

For woad, as an indoxyl-plant, the alcohol-experiment can be improved by changing it into an »amoniac-experiment«, by which the percentage of indigo is much heightened. If near the woadleaves in the glass-box a vessel with ammoniac instead of alcohol is placed, death follows almost instantly. The leaves then first become of an intense yellow and afterwards, by the indoxyl-oxidation, of a deep blue colour. By subsequent extraction with alcohol the leaves become deeply blue as compared to the lightly coloured »alcohol-leaves«. The »ammoniac-experiment« proves that all growing parts of the woad, even the roots, the rootbuds [3]), the cotyledons and the hypocotyl, contain indoxyl.

The explanation of the »alcohol-experiment« is, of course different for the different indigo-plants. This explanation must at the same time elucidate the following fact: Suddenly killed leaves, for instance leaves, which have been kept in vapour of 100° C., do not colour at the air, neither of woad, nor of *Polygonum*, nor of *Indigofera*, why then do they become blue when slowly dying off?

---

[1]) Sitzungsber. d. k. Akad. d. Wiss. zu Wien, Bd. 102, Abt. I, pag. 269, 1893; Bd. 107, pag. 758, 1898, and Berichte d. deutschen Botan. Gesellsch., Bd. 17, pag. 230, 1899.

[2]) Quite wrongly Mr. Molisch declares: »Die präcisesten Resultate erhält man bei *Indigofera* mit der ‚Alkoholprobe'«, and as wrong is his assurance »Durchwegs war zu bemerken, dass die in Europa gezogenen Pflanzen (von *Indigofera*) auffallend viel weniger Indigo liefern wie die tropischen« (Berichte d. deutsch. Botan. Ges., Bd. 17, pag. 231, 1899).

[3]) The production of leafbuds on the roots of the woad seems nowhere else mentioned. Other biennal Cruciferae produce also rootbuds, for exemple *Brassica oleracea* *Sisymbrium alliaria* and *Lunaria biennis*.

The answer for *Polygonum* and *Indigofera* lies partly at hand. By the temperature of the boiling-point, the indigo-enzyme has been killed, so the indican can no more be decomposed. If slowly dying, on the contrary, the indigo-enzyme can become active and indoxyl is formed [1]. But the explanation of the second part of the process, that is the transformation of indoxyl into indigo, — at the same time the only point which for woad, as an indoxyl-plant, requires our attention, — is less clear. I think that the course is as follows. In slowly dying leaves the indoxyl changes into indigo-blue, because, in this form of death of the cells, some alkali originates. In suddenly killed leaves, on the other hand, alkali-formation does not occur, they do not grow blue, and the indoxyl disappears in another way.

If in the leaves of indigo-plants the presence of an oxidase, acting on indoxyl, could be demonstrated, this would certainly explain quite well the action of higher and lower temperatures. But, as I said, I could not convince myself of its existence, so that I am necessarily led to the alkali-hypothesis.

The cause of the great lack of indigo-blue which, as above observed, diminishes the value of the »alcohol-experiment«, lies in the fact, that during the slowly dying of the leaves *at the air*, a considerable quantity of indoxyl is lost in an unknown way. And in this circumstance I see one of the reasons why, in woad-leaves, there is produced so much more indigo by the »ammoniac-experiment« than by the »alcohol-experiment«, because in the former the leaves die almost instantly, whilst the latter requires much more time.

With *Indigofera*, as said above, the »alcohol-experiment« produces hardly any indigo. I have therefore tried to substitute for it a better one, which is effected in the following way, and by which, also excellent results are to be obtained with *Polygonum*.

At the direct action of ammoniac, indican-plants form no indigo at all, for thereby not only the protoplasm is killed, but the indigo-enzyme, too, is so quickly destroyed that it cannot decompose the indican. But we can, before exposing to the alkaline vapour, decompose the indican and free the indoxyl, by making the plants die by complete exclusion of air, but which in this case should occur in such a way, that the indoxyl remains within the plant itself. Indican-plants turn then into »dead indoxyl-plants« and can in this condition, quite like the living woad, be subjected to the »ammoniac-experiment« with a very good result.

The simplest way by far to reach the double aim of killing the plants by exclusion of air and leaving the indoxyl in the cells, is by entirely plunging them into mercury, whereby asphixion follows with surprising quickness, the protoplasm becoming permeable and the indigo-enzyme and the indican mixing together. At a proper temperature [2] the indican is then decomposed after a few hours and the freed indoxyl remains in the leaf, albeit not exclusively in the cells in which originally the indican was localised. The leaf is then taken out of the mercury, ammoniac-vapour is allowed to act upon it, and at last the chlorophyll is extracted by boiling with alcohol and

[1]) Also a slow death of the leaves by drying or by frost renders the protoplasm permeable and the indigo-enzyme active.

[2]) The influence of temperature on the action of the indigo-enzyme is interesting, I hope on another occasion to return to it.

some hydrochloric acid. Even old *Indigofera*-leaves, which by the »alcohol-experiment« become quite colourless, take a brillant blue colour by this »mercury-ammonia-experiment«.

Before I had worked out the mercury-method, I examined the results of killing the leaves by the asphixion in hydrogen, carbonic acid and the vacuum, in each case followed, in the same manner as in the mercury-method, by subsequent exposition to ammoniac-vapour and extraction of the chlorophyll with alcohol.

When the hydrogen was mixed with air a singular phenomenon was observed: the indoxyl disappeared so completely from the leaves, that, after the said treatment, they became quite colourless, whilst pure hydrogen produced intensely blue leaves.

In the carbonic-acid atmosphere there appeared, with the indigo, a small quantity of brown pigment, probably because the carbonic acid was not wholly free from air. The action of pure carbonic acid I have not yet examined.

The vacuum in a barometer-tube, above mercury, gives the same result as the submersion in mercury itself, but this method is, of course, more complicated.

3. *On the »coloured strip« in partly killed leaves.*

The following phenomenon is in near relation to the preceding. In many leaves, when partly dying off, a coloured matter will appear, just on the border between the living and the dead tissue; with woad and with *Polygonum tinctorium*, the chromogene of this coloured strip is indigo [1]). The experiment succeeds best if the leaf is partly killed by keeping it for a moment in the vapour of boiling water. The killed part remains green, although it may be a little more brownish than the living one.

As for woad I think the phenomenon should be explained as follows.

On the border between the dead and the living tissue, a strip af cells must occur which are in a condition of slowly dying. According to the preceding description, alkali will be formed in these cells and the indoxyl quickly oxidises to indigo-blue, nothing of it finding time for disappearing in another way. If the partly killed woad-leaf, immediately after death sets in, is exposed to ammoniac-vapour, it becomes, as might be expected, over its whole extent deeply blue. If it is, before the action of the ammoniac, left for some time to the influence of the air, then some indoxyl gets lost from the killed part which colours with ammoniac, a little less strongly than what remained living.

For *Polygonum tinctorium* the explanation is somewhat different, because the indoxyl must first be originated by the action of the indigo-enzyme. But this enzyme is destroyed by the hot vapour in the quickly dying part, whilst on the border between the living and the dead part there must be a number of cells in which the protoplasm is killed or hurt, but in which the enzyme remains active. During the dying the protoplasm becomes permeable, indican and enzyme are mixed up, and indoxyl-formation is the result. But in the same cells there occurs, in consequence of the

[1]) With woad this experiment succeeds best with leaves from the rosettes of the first year in June; with *Polygonum* always equally well. In many other plants the »coloured strip« does not contain indigo but a black or a brown pigment

slowly succeeding death, an alkaline reaction, by which the indoxyl soon oxidises to indigo-blue, which therefore precipitates in these cells alone, and not in the quickly killed nor in the living cells. Put into ammoniac-vapour the living, as well as the dead part oft the *Polygonum*-leaf remain uncoloured, in opposition to the woad-leaf, this, after the preceding, requires no further elucidation.

Of course, these phenomena would find a somewhat simpler explanation if they could be brought back to the action of an oxidase, present from the beginning. But an oxidase, producing indigo from indoxyl is, as said, not to be found.

To conclude I wish to observe, that some other phenomena, which are attributed to the effect of a »wound-irritation«, for instance, the formation of starch and of red pigment, as also the development of warmth in hurt parts of plants, possibly repose also on alkali-formation in or near the damaged cells.

On Indigo-fermentation[1]).

Proceedings of the Section of Sciences. Kon. Akademie van Wetenschappen. Amsterdam, Vol. II, 1900, blz. 495—512. — Verscheen onder den titel »Indigo-fermentatie« in Verslagen Kon. Akademie van Wetenschappen, Wis-en Natuurk. Afd., Amsterdam, Deel VIII, 1900, blz. 572 - 590.

At a former occasion it was demonstrated[2]) that the indigo-plants may be brought to two physiologically different groups, viz. indoxyl-plants, to which the woad *(Isatis tinctoria)* belongs and indican-plants. Of the latter, which seem the most numerously represented, were examined *Indigofera leptostachya*. *Polygonum tinctorium* and *Phajus grandiflorus*[3]). The result was that they contain specific enzymes differing from one another, which split the indican into indoxyl and glucose, while in woad there is no such enzyme. Indican can moreover be decomposed by katabolism[4]), i. e. by the direct action of the living protoplasm, which has been observed in some indicanplants, beside enzyme-action. Various microbes, too, can decompose indican and here the decomposition is generally effected by katabolism only; some species, however, contain specific indigo-enzymes. Hence the word »indigo-fermentation« means two quite different processes: a katabolic and an enzymatic process, and the enzymes are of twofold origin, products of higher plants and products of microbes. It is clear that in the formation of indigo from woad, in which no glucoside but free indoxyl occurs, there can be no question of »indigo-fermentation«.

1. *Preparation of the Indican as used for the Experiments*[5]).

For the preparation of indican-solutions from indican-plants, a method was described (l. c. p. 122) the principle of which is so quickly to destroy the enzyme that the glucoside can be dissolved without decomposition[6]). This is best done for *Indigofera* and *Polygonum* by immersion in boiling water, by which an extraxt is obtained

[1]) I am indebted to Mr. J. F. B. van Hasselt and Mr. A. van Delden for assistance in the following study.

[2]) »On Indigo-formation from the Woad *(Isatis tinctoria)*«. Proc. Royal Acad. of Sciences. Amsterdam. Sept. 30, 1899. p. 120.

[3]) Received under this name from a horticultural institution.

[4]) For this expression see: Centralbl. f. Bacteriologie 2e Abt. Bd. 6. p. 5, 1900.

[5]) Further informations about the indican and the enzyme of *Indigofera* are found in the recently published interesting paper of Mr. J. J. Hazewinkel. Maandelijksch Bulletin van het Proefstation voor Indigo. Klaten (Java) Aflevering I. Januari 1900. Samarang.

[6]) For the production of many other glucosides the same method can be applied.

of 0.5 to 1 pCt. indican, which as such, or after mixing with gelatine or agar is fit for bacteriologic or enzyme experiments.

The leaves of *Phajus grandiflorus* decompose the indican at high temperatures with so much energy, that the extraction by boiling does not produce indican but indoxyl, so that I first took *Phajus* for an indoxyl-plant. In this case, in order to perform the experiment at low temperature without indican decomposition, the preparation should be effected in presence of an enzyme poison which does not act on indican. To this effect the leaves are rubbed down in caustic lime or baryta, then filtered and carbonic acid passed through; after filtering again a very pure indican-solution is obtained [1]). The leaves can also be boiled in diluted ammoniac and the superfluous ammoniac be removed by evaporation. Another method is to crush the leaves under alcohol by which the enzyme, though not destroyed, precipitates in the cells, while the indican dissolves in the alcohol and after evaporation of the latter can be taken up in water.

By evaporating the solutions to dryness, the impure indican results as a brown mass, resembling sealing-wax, which can be powdered and, in dry condition, be kept unchanged an unlimited length of time. The crude, neutralized or feebly alkaline-solutions, when sterilized and preserved from access of microbes, also remain unchanged for many months [2]).

A purified indican-preparation is obtained from the decoctions by evaporating them to dryness with caustic lime or baryta, dissolving in little water, filtering, passing through carbonic acid or precipitating the baryta with aluminium sulphate, then again filtering and evaporating to dryness. The thus formed preparation contains fewer pigments and fewer proteids than the crude solutions.

The impure or thus purified indican is fit for mixing with a solid medium destined for microbe-cultures. On such »indican agar« or »indican gelatine« poured out to plates, colonies or streaks of microbes produce or do not produce indigo, according to the species. Of this later more.

For our experiments we used the decoction or the crude indican prepared from it, either or not purified with lime, of *Polygonum tinctorium* and *Indigofera leptostachya,* cultivated partly in the garden of the Bacteriological Laboratory at Delft, partly at Wageningen, and kindly procured by Mr. van Lookeren Campagne. I also received from Mr. Hazewinkel of Klaten, Java, perfectly well preserved extracts of *Indigofera* in tins, together with crude enzyme prepared from this plant.

2. *Preparation of the Enzymes.*

For this preparation I followed the method pointed out before (l. c. pag. 124). The plants are rubbed fine in a mortar under alcohol and during the rubbing the alcohol is a few times renewed. In the beginning alcohol of 96 pCt. is taken, which is sufficiently diluted by the juice of the plant, but afterwards some water is added

[1]) The extraction with caustic lime has also been applied by Mr. Hazewinkel for *Indigofera.*

[2]) But after a very long time the amount of indican diminishes when air finds access. When air was excluded I could note no change in the solutions.

as otherwise the chlorophyll-pigment cannot be completely extracted from the [illegible]les. I suppose this must be explained by the strong water-attracting power of the alcohol, which produces from the protoplasm a proteid, impervious to the chlorophyll pigment and possibly to the alcohol itself, but which, by water, becomes again permeable. In this operation the indigo-enzyme is precipitated in the cells and this occurs so quickly that the indican, which is soluble in alcohol has disappeared before its decomposition can set in. As by this method the chlorophyll is completely extracted by alcohol, a colourless product is obtained, which, after drying, first at 37° C. and then at 55° C., is a snow-white powder, directly, or after further pulverising, fit for enzyme experiments. In stoppered bottles I have kept such preparations for months without observing any decrease of activity [1]).

As, in the preparation of the indigo-enzyme from *Polygonum tinctorium* decomposition of the indican occurs much more easily than with *Indigofera,* it is necessary, in order to get colourless preparations from this plant, to proceed with greater precaution and to kill the protoplasma more quickly. This is done by taking only a small quantity of leaf substance at a time for the rubbing in the mortar so that the alcohol can penetrate in a few seconds. With *Indigofera* much larger quantities of leaves may be taken, without fear of obtaining preparations coloured by indigo.

As I could not point by the ammoniac-experiment, the presence of free indoxyl in *Polygonum* leaves, I thought at first that the difference was to be explained by admitting that the enzyme of *Polygonum* is more soluble in water than that of *Indigofera* and so, during the extraction could perhaps in higher concentration act on the indican. But the experiment showed that this is not the case. Neither can the acid reaction of the juice of *Polygonum,* caused by kalium bioxalate, account for this difference, as the addition of this salt, kalium biphosphate, or of a little acid, to the materials used for the preparing of the enzyme from *Indigofera,* produces no change in the course of the phenomena. The addition of asparagine is likewise without effect. Nor is the explanation to be found in the relation of both enzymes to the temperature. I have so come to the conclusion that in *Polygonum* part of the indican is decomposed by the direct action of the living protoplasm itself. This part is however small, and by quickly immersing in boiling water the protoplasm is killed before it causes decomposition.

In the preparation of indigo-enzyme from *Phajus grandiflorus* nothing particular is observed. But we saw before that the decoction method produces no indican but indoxyl from this plant.

As the figure below shows that the enzyme of *Phajus* becomes inactive already at a lower temperature (67° C.) than that of *Indigofera* (75° C.), I must admit that also in the leaves of *Phajus* katabolism exists together with enzyme action and that also in the geaves of *Phajus* katabolism exists together with enzyme action and that, at the immersion in hoiling water, simultaneously with the dying af the protoplasm, this katabolism causes a vigorous indican decomposition [2]). Hence *Polygonum*

[1]) The loss of activity in enzyme preparations may be compared to the loss of germinating power in plant-seeds. If they are kept in complete absence of water, both the activity of enzymes and the germinating power of seeds, will last an unlimited length of time.

[2]) In § 3 p. 513, will be demonstrated that all the indican is localised in the rotoplasm.

and *Phajus* agree in so far as in both indigo-fermentation is caused by katabolism and by enzymes; but they differ in the fact that in *Phajus* the katabolism is quickened by high, in *Polygonum by low temperature.* In *Indigofera* katabolism seems not to occur at all and the decomposition of indican appears exclusively effected by the enzyme.

From the preparations obtained in the way described, the enzyme itself can but be imperfectly extracted. In water it proves almost quite insoluble, somewhat better, in glycerine and best of all in a 10 pCt. solution of common salt, as was already indicated by Mr. Hazewinkel, and in a 10 pCt. solution of calcium chloride. In these solutions only a small quantity of enzyme is soluble, for the remaining substance is nearly as strongly active as before the extraction. In the solutions themselves alcohol produces hardly any precipitate, so that more active preparations cannot be procured in this way. Accordingly the best results in the enzyme experiments are obtained by crude enzyme finely powdered.

3. On the Distribution of Indican and the Indigoenzymes in the Plants.

By the examination of the different parts of indigo- and other plants in the two ways described, the distribution of the indican and the indigo-enzymes was established. It was thus made evident that both commonly occur or lack together.

They are accumulated in the leafy organs, especially in the green leaves; in flowers and flower-buds they are in smaller quantity. In the seeds and germs they fail entirely. The roots and stems of *Polygonum tinctorium* and of *Indigofera leptostachya* are also quite or nearly quite devoid of indican and indigo-enzyme. Only in transverse sections of branches of the latter, kept for some days in strongly diluted indican solution, I could detect traces of indigo-blue particularly in the medulla and the medullary rays and in the bark, which shows that these parts contain some, but very little-indigo-enzyme. The absence of enzyme and indican in the stem and roots of *Polygonum tinctorium* can be easily shown as the stems of this plant have a great disposition to form radiculae which are, as the stems, by their herbaceous nature and broad-celled structure, quite fit for such experiments. If the roots are allowed to die off in a chloroform-atmosphere they remain colourless; this is likewise the case when the dying is occasioned by immersion in mercury followed by treatment with ammoniac vapour. But from this follows only that indican and enzyme do not occur together; if but either of them is present it is not detected by this experiment [1]), but may be demonstrated as follows.

If indigo-enzyme is added to a decoction made from the stems or roots of *Polygonum tinctorium,* or if this decoction is boiled with hydrochloric acid and a little ferrichlorid to decompose the indican and oxidise the indoxyl, then no indigo appears: so, indican is absent.

That in the said parts indigo-enzyme, too, is wanting follows from the fact that parts of stems and roots finely crushed in alcohol, after filtering, off and drying, pro-

[1]) This should be kept in view with regard to the »alcohol-experiment« of Mr. Molisch.

duce a powder quite inactive on indican-solution. Even the growing point and the region of growth of the roots contain no enzyme [1]), as thin slices killed in alcohol, remain quite colourless in indican-solution at 45°. The same is the case with entire roots which, after killing in alcohol, are put in indican-solution.

From these facts seems to follow that the growth and development of indican-plants is not in inseparable relation to the presence of indican and enzyme.

To this result we are also led concerning the relation between the development and the presence of indoxyl in the woad, though its distribution in this plant is somewhat different from that of the indican. In woad the indoxyl occurs, besides in the young leaves, and buds, also in the young rootperidermis, in the root-buds and in the growing root-ends [2]). The distribution af the indican agrees with that of the indoxyl in the fact they are both completely wanting within the thicker stems and all the thicker roots. So there is in woad no indoxyl in the inner part of the stem organs of the leaf-rosettes in spring, when they are ready to elongate and push out the inflorescence which is then in the very period of the most intensive cell-partition and cell-elongation. Likewise, there is no indoxyl in the cambium and the secondary tissues of the woad-roots. Even the flower-buds are in an early, period, and when still growing vigorously, free from indoxyl; likewise the embryos, seeds and fruits. First at the germination indoxyl can be pointed out in the seeds and other parts of the germinating plant. So it is very probable that neither indican nor indoxyl are necessarily related to the growth or development of the indigo-plants. But the possibility remains that in certain cases these substances originate as quickly as they disappear. So, in the young leaves of *Indigofera leptostachya*, when kept some days in the dark, a little indoxyl may be detected by means of the ammoniac-experiment, while the normal plant is in all its parts quite free from indoxyl, whence it seems possible, that in normal conditions, there is a continual splitting of indican, which is not observable only because the freed indoxyl directly forms indican again with freshly supplied sugar. For the rest, the woad, of which all full-grown parts are devoid of indoxyl, proves that this substance can relatively quickly disappear.

The appearance of indican, particularly in the peripheric parts of the aerial organs, and the bitter taste it gives them, might suggest the idea that, like tannin, it serves as a defensive against insects and snails. But this supposition would explain only the function of the indican but not that of the splitting products and the indigo-enzyme. If a beneficient influence on the growth in general could be ascribed to indoxyl, then a useful action of this substance on the curing of hurt parts would become probable. And this would also spread more light on the function of the indican and the enzyme, for then it would be clear that the enzyme-action, which operates at the very dying off of the hurt cells, would promote the curing, not only by the formation of indoxyl but also by the production of glucose.

As to the localisation in the cell, I found the leaves of *Phajus grandiflorus* by their broad-celled structure fit for demonstrating microchemically indican as well as indigo-enzyme.

---

[1]) While in the stem these parts are extremely rich as well in indican as enzyme.

[2]) Which shows that the formation and accumulation of indoxyl is possible in the dark as well as in the light.

The indican can be precipitated as indigo-blue or indigo-red, and both ways point out that it is present in the protoplasm and wanting in the cell-walls, cell-nuclei, and cell-sap. To demonstrate this a not too thin microscopic transverse section of a leaf is put in living condition in a boiling mixture of strong hydrochloric acid and ferrichloride. The indican is suddenly decomposed and the freed indoxyl as quickly oxidized into indigo-blue, which is easily detected under the microscope as a precipitate in the shape of small blue granules in the colourless protoplasm of the green parenchyma and the epidermis. I could not trace it with certainty in the chlorophyll-granules.

If the sections, in living condition, are put in a boiling mixture of hydrochloric acid and isatine, the indican passes into indigo-red, which sets off in the protoplasm as very characteristic red crystal needles [1]).

The enzyme, on the contrary, is exclusively accumulated in the chlorophyll-granules as is proved by the following.

If living microscopic sections of leaves of *Phajus* are put in an indican-solution (e. g. in a decoct of *Indigofera* or *Polygonum)* they become blackish blue in a short time, which colour is exclusively caused by indigo-blue precipitated in the chlorophyll-granules. In the epidermis much indigo is precipitated only in the cells of the stomata, elsewhere none at all. If the microscopic sections are beforehand killed and extracted with alcohol, the enzyme spreads in the cell but remains confined within the cell-walls, so that, by putting them into an indican solution they become of a uniform intense blue, in which only the bast bundles remain colourless.

The accumulation of enzyme in the chlorophyll-granules is perhaps connected with the formation of starch from the glucose of the indican.

As to the localisation of indoxyl in the leaves of woad I have acquired no certainty, but I suppose that, like indican, it occurs only in the protoplasm.

The hypothesis of Mr. Molisch [2]) according to which indoxyl and indican should be in close relation to the decomposition of carbonic acid in the chlorophyll, appears contrary to the great accumulation of indoxyl in the root-peridermis, which is completely free from chlorophyll, and in the colourless root-buds of the woad, which seems unnoticed by Mr. Molisch. Nor do I think his arguments and figures convincing for the occurrence of indoxyl and indican in the chlorophyll-granules; moreover was Mr. Molisch unacquainted with the existence of indigo-enzymes and their localisation.

Elsewhere than in the indigo-plants indigo-enzymes seem but seldom to occur. Like Dr. van Romburgh [3]) I observed that emulsine of almonds decomposes indican, and in § 6 the intensity of this action is graphically represented in connection with temperature.

The said fact may serve to demonstrate in a simple way the localisation of emulsine in almonds. If thin sections of the seedlobes are put in an indican-solution at

---

[1]) The presense of indoxyl in urine may be shown with much more certainty and exactness in the form of indigo-red than of indigo-blue. To this end the urine is boiled with hydrochloric acid and isatine by which the colour grows red. At cooling the indigo-red crystallises in characteristic microscopic needles. These are easily filtered and dissolve beautifully red in alcohol (best is to boil out the whole filter with alcohol).

[2]) Berichte der deutschen Bot. Gesellschaft, Bd. 17, p. 230. 1899.

[3]) Communicated by Mr. Hazewinkel, Maandelijksch Bulletin N°. 1, pag. 8.

50° C., the vascular bundles will first take a deep blue colour, which shows that there the emulsine is the most accumulated. Then the parenchyma around them grows blue, and finally the more peripheric parenchyma. This points out that the emulsine is nowhere wholly absent is accumulated about the confines of the central-cylinder, which becomes distinctly visible by this experiment [1]).

A rather great number of other plants examined for indigo-enzymes have all given negative results [2]).

Neither is indican decomposed by sections of branches or leaves of apricots, pears, apples, peaches, while in the kernels of the fruits of these species a feebly decomposing emulsine is found.

Malt, malt-diastase, pancreas, papayotine, pepsine and saliva are inactive; likewise mustard-seed and myrosine prepared from *Tropaeolum majus*.

Glucase, from maize does not decompose indican, which is the more noteworthly as amygdaline is decomposed by it.

4. *Decomposition of Indican by Microbes in general.*

Mr. Molisch has drawn attention to the fact, that various species of microbes give rise to indigo-formation from indican and that others do not, which may be rendered useful for differential diagnosis. He experimented with the decoct of *Polygonum tinctorium* or *Indigofera* mixed with agar or gelatine, pouring it out to plates and using these as a solid nutrient. Aerobics and temporary anaerobics from the soil or from canal water sown out on it will develop, and in and around the colonies which split the indican, indigo-blue will separate out in microscopic lumps or globules which often show crystal structure. The »indican microbes« are in this way elegantly distinguished as pigment-microbes among the non-decomposers [3]).

---

[1]) Nearly the same has been found by Johannsen, who examined the decomposition of amygdaline with separate parts of the seedlobes. (Ann. Sci. Nat. Botan. Série 7, T. 6, p. 118, 1887.)

[2]) So I could not find indigo-enzymes in: *Indigofera dosua, Polygonum persicaria, P. aviculare, P. fagopyrum, P. bistorta, P. sacchalinense, Trifolium repens, T. pratense, Medicago sativa, Lotus corniculata, Pisum sativum, Vicia faba, Robinia pseudoacacia, Baptisia australis, Melilotus caeruleus, Spiraea filipendula, S. ulmaria, Rubia tinctorium, Asperula odorata, Solanum tuberosum, Amsonia salicifolia, Asclepias cornuti, Scorzonera hispanica, Linaria vulgaris, Stellaria holostea, Cochlearia armoracia, Brassicca oleracea, Isatis tinctoria, Iris germanica.*

[3]) Sitzungsber. der Akad. d. Wiss. zu Wien. Math. Naturw. Classe, Bd. 107, p. 758, 1808. Mr. Molisch enumerates the following species as decomposing indican: *Bacillus anthracis, B. prodigiosus, Streptothrix odorifera, S. dichotoma, Sarcine lutea, Penicillium sp.* and *Mucor mucedo*; as non-decomposing: *Streptococcus pyogenes, Staphylococcus pyogenes aureus, Bacillus subtilis, B. coli communis, B. fluorescens liquefaciens, B. megatherium* and pressed yeast. Mr. van Hasselt and I saw no decomposition with *Acetobacter aceti, A. ranscens, Bacillus cyaneus, B. cyanogenus, B. pyocyaneus, B. diastaticus, B. prodigiosus, B. pseudotuberculosis.* Many spore-forming bacteria, such as *B. subtilis, B. megatherium, B. pulcher, B. mesentericus* and others sometimes decompose and sometimes do not. Further there is no indican splitting by beeryeast (*Saccharomyces cerevisiae*), wine-yeast (*S. ellipsoideus*), pressed-yeast (*S. panis*), *S. mycoderma, S. passularum, S. uvarum, Schizosaccharomyes octosporus, S. pombe* and by the following moulds; *Aspergillus niger, A. oryzae, Amylomyces rouxii, Mucor oryzae, Oidium lactis, Endomyces magnusii.*

The indican, as a powder, may be added in a percentage of 0.5 to 1 pCt. to solid or liquid nutrients, adapted for the examination of specific mikrobe groups.

I found that some species decompose indican with extraordinary facility. Especially the common ferment-bacteria af plant infusions, which of late I united in the genus *Aërobacter*[1]), decompose with so much intensity, that they may with some reason claim the name of »indigobacteria«; they will later be discussed in particular. For the species which split with more difficulty this power depends on circumstances not yet quite clear to me. It may occur that in pure cultures colonies of one and the same origin, and separated from the common stock by a few generations only, behave quite differently, so that species, which for a long time I considered as non-decomposing, later proved vigorous indigo-producers. This I observed for instance in the photogenic bacteria of the Northsea. I suppose this fact to be connected with the influence of the sugar freed at the splitting of the indican, as other experiences prove that this influence is not constantly the same for all individuals of a species. That especially glucose acts vigorously on the life of some bacteria, and, even in small quantities, e. g. 0.05 pCt. to 0.1 pCt. may be a violent poison for some photogenic bacteria, I proved before, and this is noteworthy as still smaller quantities are favourable to the same species.

That the different conditions of the bacteria may be of influence on their power for decomposition, follows for instance from the fact that *Bacillus radicicola,* from the tubercles of *Pisum sativum* and *Trifolium,* decomposes the indican, while this is not done by the bacteroids of the tubercles of these plants. Closely allied species may also behave differently; thus, *Bacillus ornithopodis,* from the roottubercles of *Ornithopus sativus,* does not decompose at all and, among lactic-acid ferments, I observed vigorous decomposition by the rodshaped ferments used in the yeast industry *(Lactobacter longus),* and no decomposition by the diplococci and streptococci *(L. lactis)* of the dairy industry. The ease with which this reaction is effected and its clear result recommend it for further research.

The splitting of the indican by microbes is operated in the same way as in indigoplants, either by katabolism, i. e. by direct fermentaction of the living protoplasm on the indican, or by specific indigo-enzymes. Consequently the forms belonging to the former group decompose the indican in living condition only[2]), those of the latter both living and dead. The experiment, demonstrating this, may be performed as follows.

Of a culture, grown on a solid nutrient substratum with copious access of air, some material is put on a glass-slide and killed in such a way that eventually present enzyme remains unhurt. This may be done by immersing the material in strong alcohol, in which it should remain at least 24 hours to be quite sure that the microbes are killed, or by exposition to ether-, alcohol- or chloroform-vapour[3]). In the latter case the microbe-material is placed in a glass-box beside a vessel with chloroform,

[1]) Centralbl. f. Bacteriologie, 2e Abth. Bd. 6, N°. 7, pag. 193. 1900.

[2]) The optimum temperature of the decomposition by katabolism agrees, for the examined species, with that of the growth.

[3]) In alcohol vapour many microbes die sooner than in strong alcohol, this having a water absorbing power and thus acting protectingly.

where ferments moulds, and most bacteria die after ½ to 1 hour already, while the enzymes in the cells remain unhurt.

If a small lump of killed microbes is put in an indican-solution, poured out to a thin layer in a white porcelain vessel floating on water of circa 45° C., then only those microbes will become blue, which contain indigo-enzyme, while those, acting by katabolism, don't cause decomposition. If in the latter case not all but only most of the microbes have been killed, there will at first be no manifest decomposition, but it will set in as soon as the living individuals have sufficiently multiplied, which is at the same time a good control of the experiment.

The microbes containing enzymes can be dried and powdered after killing and such »crude enzymes«, when kept dry, preserve their activity very long. By the little dissolubility of the indigo-enzymes in water, glycerine and salt-solutions, it wis not possible by extracting the crude enzymes and precipitating with alcohol, to obtain more active preparations from them.

It has been proved that all examined bacteria, blastomycetes[1]) and moulds, which decompose indican, do not effect this by enzymes but by katabolism, while among alcohol-ferments both cases occur. So indican is decomposed katabolically by *Saccharomyces ludwigi* and *Monilia candida,* while *Saccharomyces sphaericus*[2]), *S. apiculatus, S. muciparus*[3]), *S. tyrocola*[4]) contain indigo-enzymes. One of these enzymes, that of *S. sphaericus,* which acts the most strongly of all, will be treated in § 6.

Here I wish to remark that indigo-enzymes originate in the yeast-cells only then, when cultured on a solid medium e. g. on wort-gelatine, with abundant access of air. When cultured in nutrient liquids, even with a current of air passing through, they produce no or only very little enzyme.

The indigo-blue, formed by most moulds and yeast-species in the decomposition of indican, is for the greater part confined within the protoplasm, as was already described and figured by Mr. Molisch (l. c.); but in those cases when decomposition is very strong, as with many bacteria, the indoxyl streams out and also precipitates outside of the cell in granules of indigo-blue.

5. *Indigo-fermentation by Aërobacter.*

When a decoction of *Indigofera* or *Polygonum* is infected with-garden-soil, canal-water or mud, and placed at 28° C., there originates, during a copious formation of indigo, a rich hacteria-flora in which the common gas-producing ferments, which I recently united[5]) in the genus *Aërobacter,* perform the chief part. The first who

---

[1]) Blastomycetes have the shape of yeast-cells but produce no alcohol. To these belong e. g. the red »yeats« *Blastomyces glutinis, B. roseus, B. granulosus* (of which the last colours deep blue with jodine), and which all decompose indican vigorously.

[2]) Under this name, given by Nägeli, I united the various forms of aethyl-acetate yeast. (Verhandelingen 5e Natuur-en Geneeskundig Congres te Amsterdam, 1895, p. 301

[3]) This name I give to a saccharose-yeast, very common in pressed yeast and which does not ferment maltose.

[4]) *S. tyrocola* is a lactose-yeast, not rare in Edam cheese. Its cultures on wort-gelatine are sometimes rose-coloured.

[5]) Centralblatt für Bacteriologie. 2e Abt. Bd. 6 No. 7. 1900.

drew attention to this fact was Alvarez, but he went too far by admitting the existence of specific bacteria for indigo-fermentation[1]). By bringing a drop of the first crude fermentation into a second quantity of a decoction and so on, an accumulation, sometimes a pure culture of *Aërobacter* is obtained[2]).

By sowing out an *Aërobacter*-fermentation on indican-gelatine, not only the *Aërobacter*-colonies, but also those of various other bacteria colour deeply blue by indigo. Commonly, however, the *Aërobacter*-species are recognised by their number. But the chief characteristic of *Aërobacter* is its fermenting power and its temporary anaerobiosis, by which the splitting of indican goes on even at temporary exclusion of air, which is not the case with the aerobics. On this characteristic is based the supplanting of the aerobics by *Aërobacter* in liquid cultures and the prevailing part which these bacteria have in the splitting of the indican in the spontaneous indigo-fermentations. In pure cultures this splitting can of course be as well effected by various common aerobics, albeit more slowly.

The decomposition of indican by *Aërobacter* is operated katabolically, as in all other examined bacteria also, so that killed bacteria are inactive and indigo-enzyme cannot be separated out. The optimum temperature for the decomposition agrees with that of the growth and is, for instance, 28° C. for a variety of *A. aërogenes* isolated from milk.

The number of *Aërobacter*-forms obtained by sowing out from the decoctions is very great but may be reduced to three chief species, described by me elsewhere (l. c. pag. 200). They are *Aërobacter aërogenes A. coli* and *A. liquefaciens*, all represented by many varieties and allied by intermediate forms. Not all varieties are equally active. So, among the forms of *A. coli*, which for the greater part decompose most vigorously, the variety *A. coli* var. *commune*, isolated from the intestines or from faeces, is but feebly active or not active at all and recognisable by this feature.

The products of the decomposition of indican by *Aërobacter* (and by bacteria in general) are the same as by enzyme action, i. e. indoxyl and glucose. If a nutrient liquid containing indican, e. g. decoct of indigo-plants, broth, or yeast-water, is passed into a fermentation tube and infected with *Aërobacter*, indigo-blue is formed in the open end, while in the closed one carbonic acid and hydrogen originate from the glucose of the indican[3]), and indoxyl which remains a long time unchanged.

In proportion as the oxidation of the indoxyl proceeds more slowly, more indigo-red is produced, similarly to the splitting of indican by enzymes and acids. Now the splitting of the indican, and consequently the oxidation of the indoxyl can proceed with much rapidity by the action of enzymes and still more rapidly by acids in presence of ferrichloride, while it is impossible to make the process go on as quickly by

---

[1]) Comptes rendus, T. 105, pag. 287, 1887.

[2]) In several other plant-infusions, not from indigo-plants, quite the same is observed. The strongest *Aërobacter*-fermentations are obtained by mixing rye-flour with water to a thick pap and placing it at 28° C. After a few hours the development sets in of carbonic acid and hydrogen, caused by the *Aërobacter*-species, never wanting in flour, which in the beginning supplant all other bacteria.

[3]) That the development of gas is due to the sugar of the indican, and not to the free sugar already present in the decoctions or the indican preparations, is proved by the fact that the gas-development is the same when beforehand all free sugar has been removed from the liquid by means of pure beer-yeast, which acts not on indican.

bacteria. So it is inevitable that the formation of indigo-red is very great in the case of the bacterial fermentation of the indican, while it is possible to reduce its amount practically to zero in the case of chemical decomposition. As it is besides hardly possible to esparate the indigo-blue from the substance of the bacteria, only an impure indigo can be obtained by means of their action.

In consequence of the growth of *Aërobacter* the reaction of plant extractions, particularly of the indigo-plants, first becomes feebly acid, later feebly alkaline by the formation of free alkali. This is also prejudicial to the production of indigo, as in acid solutions the indoxyl oxidises very slowly, by which again much indigo-red is formed, while at the same time part of the indoxyl gets lost in another way.

Worthy of note is the influence of various sugars on the indican decomposition by *Aërobacter*. Mr. van Hasselt found that already ½ pCt. glucose, as well in liquid cultures as in gelatine experiments, prevens decomposition, while much larger quantities, even to 10 pCt. of cane-sugar, maltose and lactose have no effect at all and levulose but very little. Evidently the very sugar produced by the splitting counteracts this splitting, while other sugars have not this effect, or in less degree. To this rule mannose makes an exception, as indican decomposition is in the same way counteracted by it as by glucose. This opposing influence gives consequently only partly and not completely the answer to the question after the nature of the sugar separated out of the glucoside by bacteria [1]).

There are however forms of *Aërobacter* which, in ferment-experiments, produce unequal quantities of carbonic acid und hydrogen from glucose and mannose, and by their help it is proved that the sugar formed from indican can only be glucose.

Nitrates, also, have a remarkably opposing influence on the production of indigo by *Aërobacter*. Common saltpetre is active already at $^1/_{20}$ pCt., which is in perfect accordance with the antifermenting action of this salt in general, on which reposes its use in the dairy industry, to prevent one the most important defects of cheese, in Holland called »rijzers«.

6. *Indican-decomposition by the Indigo-enzymes.*

The indigo-enzymes prepared from *Indigofera leptostachya, Polygonum tinctorium, Phajus grandiflorus*, aethyl-acetate-yeast *(Saccharomyces sphaericus)* and emulsine of sweet almonds, have been compared as to their intensity of action on indican at different temperatures, for which notable differences have been found. No other group of enzymes is known to lead with equal ease and certainty to the determination of these relations as this group of the indigo-enzymes.

The experiments were conducted as follows. Of solutions of about 0.5 pCt. indican [2]) 10 cc. were passed into equal test-tubes selected for the purpose. After heating them tc the required temperature in a large beakerglass, 'arranged as waterbath, with

[1]) Mr. van Hasselt prepared the osazon from the indican-sugar and found, after recrystallisation from alcohol, the melting point to be at 105° to 100° C., that is nearly the same as that of glucosazon, which is 204° to 205° C. But the melting point of mannosazon is about as high.

[2]) Stronger solutions give no more exact results.

thermoregulator and thermometer, the enzyme was added and the temperature kept constant.

After a few hours the tubes were taken out, alcalised and the indoxyl oxidised by strong shaking, then acidified, by which a very fine, equally divided, purely blue precipitate of indigo-blue is obtained, which allows colorimetrically to establish the intensity of action with sufficient exactness.

It proved wholly indifferent whether in these experiments use was made of the indican of *Indigofera* or of *Polygonum*. Evidently it is the same in both plants.

Great attention should however be paid to the degree of acidity of the indican solutions. The most favourable enzyme action was observed at the rate of about 0.5 cc. normal acid per 100 cc. liquid. An increase of the acid to 2 cc. slackens the reaction notably; likewise the addition of alkali to feebly alkaline. Acid salts, as kalium-bioxalate and kaliumbiphosphate, act in the same way as free acids.

The quantities of the enzymes employed for the experiments amounted to 2—60 milligrams of finely powdered crude enzyme per 10 cc. of the ½ pCt. indican-solution.

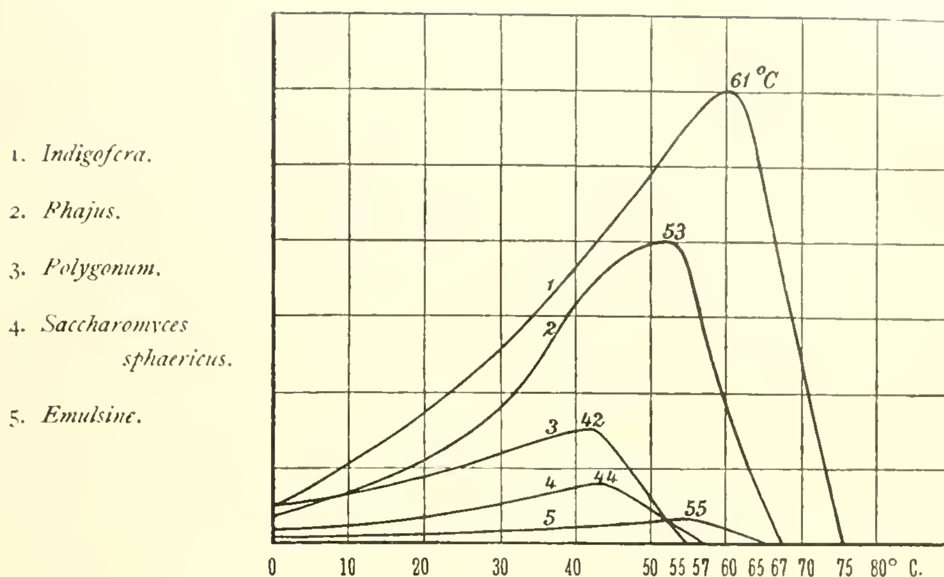
First of all was now established the maximum temperature at which the action of the enzymes ceases entirely, that is, where the enzymes are nearly suddenly destroyed. For *Indigofera* this maximum is at 75° C., but when using a great deal more enzyme a feeble action could still be observed at 78° C. which however quite ceased at 80° C. For *Polygonum* the maximum temperature is at 55° C., and in large quantities a feeble action was still observable at 60° C. For this determination the tubes were placed, for *Indigofera*, at 72°.5, 75°, and 80° C., for *Polygonum*, at 52°.5, 55°, 58° and 60° C. For both enzymes the action at the rising af the temperature diminishes very quickly near the maximum. In a similar way were found as maximum temperatures for *Saccharomyces sphaericus* about 60° C., for *Phajus grandiflorus* 67°, and for emulsine 70° C.

After this the optimum temperatures for the enzyme action were fixed, for *Indigofera* by searching between 55° and 65° the maximum intensity of indigo-formation, testing all temperatures from 55°, 57°, 59° C. and so an. The strongest inversion was found at 61° C. both for powdered crude enzyme and for enzyme-solution in 10 pCt. common salt and 10 pCt. calcium chloride. Changes in the degree of alkalinity or acidity within the narrow confines between which enzyme action is at all possible, deplace the optimum temperature but little [1]). A difference in temperature of 1° C. was only to be observed between 61° and 62°; at 62° C. the decomposition was certainly a little feebler, but between 60° and 61° C. there existed some doubt. At lower temperatures distinct differences in the intensity of the decomposition could only be noted at intervals of 2° C.

The enzyme of *Polygonum*, examined in the same way between 35° and 45° C., gives the most copious production of indigo at 42° C., with a rapid decrease in action above, a slow one below that point.

---

[1]) Mr. van Delden found upon addition of acid both for *Indigofera* and *Polygonum* a rising of 1° in optimum, which however disappeared when the employed solutions of crude indican were diluted with an equal volume of water and then, before the addition of enzyme, were brought to the same acidity.



For aethyl-acetate-yeast the optimum lies at 44°, for *Phajus* at 53° C., and for emulsine at 55° C. [1]).

Particularly for emulsine the intensity of action is feeble, and the feebler it is, the more troublesome exactly to fix the temperature-optimum, as is clearly shown by the course of the curved line in the graphic representation.

For the exact determination of the shape of the curved line which indicates the general relation between decomposition and temperature, temperatures above and below the optimum were sought, at which the quantities of indigo, formed after an hour's action, were quite the same. In a system of coordinates with the temperatures as abscisses and the intensity of decomposition as ordinates, these points have then equal ordinates and by determining some such couples the whole course of the curve becomes known. When looking at the curves found in this way we see that the decrease of action above the optimum is much more rapid than the rising below and that the last rising is not proportioned to the temperature.

At the same temperature the indican-decomposition by the various enzymes is operated with very unequal intensity. Proportionate ciphers between them were fixed as follows. In the experiments described before, so much of the enzymes to be compared was added to 10 cc. of indican-solution that at the optimum temperatures effects of equal intensity were observed. This proved to be the case when use was made of the following quantities of crude enzyme in milligrams: *Indigofera* 5, *Polygonum* 20, *Saccharomyces sphaericus* 40, emulsine 100, which numbers stand to one another as 1 : 4 : 8 : 20. When all these quantities were doubled or reduced to the half, the proportions underwent no change. Consequently from these numbers follows that the intensity of decomposition for the different enzymes is expressed thus:

---

[1]) As is seen, the difference between the optimum and maximum temperature is for all enzymes about 14° C.

Indigofera 20, *Polygonum* 5, aethyl-acetate-yeast 2.5, emulsine 1. In the graphic figure the length of the ordinates is taken proportionately with these numbers.

So we find that the curve of the *Polygonum*-enzyme is about uniform with that of the much stronger enzyme of *Indigofera,* but at 0° C. they cross each other, so that at a still lower temperature the action becomes an inverse one.

The great difference in intensity of action is also proved by the fact, that, for the manifest appearance of indigo in 10 cc. of the indican-solution, there is at least required of the different crude enzymes 2 milligrams of *Indigofera*. 20 of *Polygonum* and *Saccharomyces sphaericus,* and 60 of emulsine.

CONCLUSIONS.

The splitting of the indican by the cell can occur in two ways: by ferment-action of the living protoplasm itself (katabolism), and by enzymes.

All examined bacteria, which act on indican, split by katabolism and hence are in dead condition inactive. The most important among them are the common ferment-bacteria *(Aërobacter)* of sugar-containing plant infusions.

All indican-plants and some species of alcohol-ferments contain indigo-enzymes and consequently can decompose the indican in dead condition too. Indigo-enzymes originate only at abundant access of air. Five of these enzymes proved specifically different, with temperature optima of 61° *(Indigofera)*, 55° (emulsine), 53° *(Phajus)*, 44° *(Saccharomyces sphaericus)* and 42° *(Polygonum)*. For all of them the action is favoured by free acid to an amount of 0.5 cc. normal per 100 cc. of the employed indican-solution; more acid, like alkali, opposes the action.

Indigofera decomposes the indican only by enzyme-action; in the case of *Polygonum tinctorium* and *Phajus grandiflorus* the indican is decomposed partly by katabolism, partly by enzyme-action.

In the leaves of *Phajus grandiflorus* indican is localized in the colourless protoplasm of mesophyll and epidermis, the indigo-enzyme exclusively in the chlorophyll-granules.
